



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

GÉRSOON CAETANO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO MOLUSCICIDA DOS EXTRATOS DE *Curcuma longa*
EM CARAMUJOS *Biomphalaria* sp. NÃO INFECTADOS E INFECTADOS POR
***Schistosoma mansoni*.**

FORTALEZA

2024

GÉRSON CAETANO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO MOLUSCICIDA DOS EXTRATOS DE *Curcuma longa* EM
CARAMUJOS *Biomphalaria* sp. NÃO INFECTADOS E INFECTADOS POR *Schistosoma*
mansoni.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- C131a Fernandes, Gérson Caetano.
Avaliação do efeito moluscicida dos extratos de *Curcuma longa* em caramujos *Biomphalaria sp.* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*. : Estudo experimental. / Gérson Caetano Fernandes. – 2024.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Patologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra.
Coorientação: Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca .
1. Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria*; moluscicida; *Curcuma longa*.. I. Título.
CDD 571.9
-

GÉRSON CAETANO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO MOLUSCICIDA DOS EXTRATOS DE *Curcuma longa* EM
CARAMUJOS *Biomphalaria* sp. NÃO INFECTADOS E INFECTADOS POR *Schistosoma*
mansoni

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria de Fátima Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Joyce Fonteles Ribeiro
Centro Universitário Uninassau.

Aos meus pais pela formação Moral, Pessoal e Intelectual, aos demais membros da família por todo suporte prestado e professores que auxiliaram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Instituição, Universidade Federal do Ceará, pelo suporte a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra, Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca e Dra. Marta Cristhiany Cunha Pinheiro, pelas orientações durante a pesquisa.

Aos professores participantes da banca Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes, Prof. Dra. Maria de Fátima Oliveira e Profa. Dra. Joyce Fonteles Ribeiro, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus familiares, em especial, meus Pais: José Fernandes Primo, Maria de Lourdes Caetano Fernandes, irmãos: José Almir C. Fernandes, José Almair C. Fernandes e Maria Cristina C. Fernandes, minha companheira Lívia Lima de Sousa, por todo suporte durante a minha jornada pessoal, profissional e intelectual.

Aos colegas e amigos da pós-graduação: Francisca Janaína, Thiago Nobre, Thiago Brasil, Camylla Almeida e João Vitor Caetano, por todo suporte, orientações e sugestões recebidas durante o processo.

Aos meus colegas de trabalho, em especial: Franciety Fonseca, Glória Maria, Evaristo Elson e Lorena Gomes, além de Jefferson Alves, por todo apoio durante este percurso acadêmico. A Augusto César R. Araújo, por todo suporte e sugestões.

Ao Instituto Rene Rachou, em Belo Horizonte, MG, Brasil, em especial a Dra. Neuza Araújo por todo suporte prestado durante os experimentos realizados neste trabalho e ao Dr. Naftale Katz por todas as sugestões a este trabalho.

RESUMO

Para controle efetivo da esquistossomose como problema de saúde pública são necessárias múltiplas intervenções para além do diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, como implementação de intervenções de WASH (água, saneamento e higiene), educação em saúde e controle populacional dos hospedeiros intermediários a partir de substâncias sintéticas ou naturais, como extratos de plantas. Atualmente não há opções de moluscidas específicos (eficazes e seguros para o meio ambiente). A niclosamida, usado rotineiramente, é prejudicial para peixes, anfíbios, certas larvas de insetos e, em doses mais altas, para a vegetação aquática, embora esses efeitos sejam geralmente de curta duração. Avaliamos o efeito moluscida do extrato de *Curcuma longa* nas concentrações de 10, 5 e 1 ppm em hospedeiros intermediários da esquistossomose, os moluscos do gênero *Biomphalaria*, sendo as espécies: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* expostos ao extrato. Avaliamos também a manutenção do efeito e a estabilidade do extrato percolado com repetição dos experimentos após 18 meses, para verificação da ação, além dos efeitos do extrato em espécie não-alvo, em peixes *Poecilia reticulata*. Utilizamos os extratos preparados em 2022 (E1) e extrato preparado em 2024 (E2) para avaliação e comparação dos efeitos em *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados e E1 para *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. O extrato obtido a partir do rizoma em pó foi submetido ao processo de maceração seguido de percolação e caracterização. Os caramujos foram expostos aos extratos sem presença do solvente e avaliada mortalidade de acordo com tempo de exposição (24, 48, 72, 96 e 168 horas), para certificação da mortalidade. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA, em duas vias (concentração e tempo de exposição). Para *Biomphalaria glabrata* não infectados o extrato etanólico E1 proporcionou melhores resultados em relação ao extrato acetônico, sendo a concentração de 10 ppm mais eficaz, entre 80% e 100% de mortalidade. Após 18 meses, o extrato etanólico se manteve mais efetivo em relação ao extrato acetônico sobre as três espécies de *Biomphalaria*, sendo menos sensível a *B. straminea*. Houve mortalidade de 100% aos peixes *Poecilia reticulata* expostos as concentrações de 10, 5 e 1 ppm do extrato. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1983, o potencial moluscida é efetivo quando proporcionar 90 % de mortalidade em 20 ppm para extrato ou frações e 100 ppm para material bruto, classificando um extrato ativo quando proporciona mortalidade entre 70 e 90 %. Assim, o extrato de *Curcuma longa* demonstrou significativo efeito moluscida em moluscos *Biomphalaria*, no entanto proporcionou toxicidade sobre espécies não-alvo, mostrando que a sua utilização como moluscida natural alternativo e específico no combate a

população de hospedeiro intermediário da esquistossomos tem uma indicação limitada até que novos testes sejam realizados demonstrando mais detalhadamente a sua ação no meio ambiente.

Palavras-chave: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria*; moluscicida; *Curcuma longa*; açafrão da terra.

ABSTRACT

In order to effectively control schistosomiasis as a public health problem, multiple interventions are needed in addition to the diagnosis and treatment of infected individuals, such as the implementation of WASH (water, sanitation and hygiene) interventions, health education and population control of intermediate hosts using synthetic or natural substances, such as plant extracts. There are currently no specific molluscicide options (effective and safe for the environment). Niclosamide, used routinely, is harmful to fish, amphibians, certain insect larvae and, at higher doses, to aquatic vegetation, although these effects are generally short-lived. We evaluated the molluscicidal effect of *Curcuma longa* extract at concentrations of 10, 5 and 1 ppm on intermediate hosts of schistosomiasis, the molluscs of the genus *Biomphalaria*, the species being: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* exposed to the extract. We also evaluated the maintenance of the effect and the stability of the percolated extract by repeating the experiments after 18 months to verify the action, as well as the effects of the extract on non-target species, in fish *Poecilia reticulata*. We used the extracts prepared in 2022 (E1) and the extract prepared in 2024 (E2) to evaluate and compare the effects on uninfected and infected *Biomphalaria glabrata* and E1 for *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea*. The extract, obtained from the powdered rhizome, was subjected to a maceration process followed by percolation and characterization. The snails were exposed to the extracts without the presence of solvent and mortality was assessed according to exposure time (24, 48, 72, 96 and 168 hours), and then placed in deionized water after 168 hours to certify mortality. Statistical analysis was carried out using the two-way ANOVA test (concentration and exposure time). For uninfected *Biomphalaria glabrata*, the ethanolic extract E1 provided more significant results than the acetic extract, with the concentration of 10 ppm being the most effective, with 90% mortality. When the experiment was repeated, the E2 extract at concentrations of 1 and 5 ppm (ethanolic) provided 80% mortality and at 10 ppm 100%. After 18 months, the ethanolic extract maintained greater effectiveness compared to the acetic extract on the three species of *Biomphalaria*, being less sensitive to *B. straminea*. There was 100% mortality in *Poecilia reticulata* fish exposed to concentrations of 10, 5 and 1 ppm of the extract. According to the World Health Organization (WHO), 1983, molluscicidal potential is effective when it provides 90% mortality at 20 ppm for extract or fractions and 100 ppm for crude material, classifying an extract as active when it provides mortality between 70% and 90%. Thus, the *Curcuma longa* extract showed a significant molluscicidal effect on *Biomphalaria* molluscs, however it provided significant toxicity on non-target species, showing

that its use as an alternative and specific natural molluscicide in combating the intermediate host population of schistosomes has a limited indication until further tests are carried out demonstrating in details its action in the environment.

Keywords: Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria*; Molluscicide, *Curcuma longa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 2 –	Dados agregados de casos de esquistossomose no mundo.....	21
Figura 3 –	Ilustração das áreas endêmicas para esquistossomose no Brasil, do início a expansão e transmissão endêmica.....	23
Figura 4 –	Áreas endêmicas para esquistossomose no Brasil.....	24
Figura 5 –	Mapa ilustrativo referente a presença das três principais espécies do gênero <i>Biomphalaria</i> no Brasil.....	27
Figura 6 –	Representação gráfica dos três compostos principais da <i>Curcuma longa</i> : I) Curcumina, II) Demethoxicurcumina e III) Bisdemethoxicurcumina.....	30
Figura 7 –	Citações relacionadas as atividades para drogas vegetais e derivados de <i>Curcuma longa</i> , bem como para substâncias isoladas de plantas e produtos naturais.....	31
Figura 8 –	Fluxograma referente as fases do trabalho, desde obtenção do material vegetal e realização dos ensaios moluscidas.....	41
Figura 9 –	Processo de pesagem e obtenção do material vegetal para posterior percolação.....	42
Figura 10 –	Extrato de <i>Curcuma longa</i> , obtido após processo de percolação.....	42
Figura 11 –	Resultado da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizada em 2022.Revelação em vanilina sulfúrica: visível fase 1, visível fase 2. UV Fase 2, UV Fase 1 (254nm).....	43
Figura 12 –	Resultado da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizada em 2024. Revelação UV 254 nm, fase 2 e fase 1.....	44
Figura 13 –	Resíduo seco dos extratos etanólico 2022 e 2024 e acetônico 2022 e 2024.....	45
Figura 14 –	Amostras em 100 ml, contendo 50 mg de <i>Curcuma longa</i> , preparada a partir do extrato seco.....	46
Figura 15 –	A -Ensaio de solubilização dos extratos de <i>C. longa</i> em água, antes da homogeneização. B: Após homogeneização em água destilada.....	46
Figura 16 –	Médias e desvios padrões das áreas dos picos principais dos três curcuminóides obtidos dos extratos etanólico e acetônicos nos anos	

	de 2022 e 2024.....	48
Figura 17 –	Solução principal de 100 ppm, extrato de <i>Curcuma longa</i> sem solvente residual.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Condições utilizadas nos ensaios dos extratos por CCD.....	36
Tabela 2 –	Médias e desvio padrão das áreas sob os picos principais dos 3 curcuminóides obtidos dos extratos alcoólicos e acetônico em 2022 e 2024.....	47
Tabela 3 –	Expressão da mortalidade de espécies de <i>B. glabrata</i> não infectadas e infectadas sujeitas a ação dos extratos de <i>C. longa</i> em diferentes concentrações recentemente preparados (E1 2022) e o mesmo extrato após 18 meses de armazenamento (E1 2024). Foram empregados 10 caramujos por ensaio.....	50
Tabela 4 –	Expressão da mortalidade de espécies de <i>B. glabrata</i> não infectadas e infectadas sujeitas a ação dos extratos de <i>C. longa</i> em diferentes concentrações recentemente preparados (E2 2024) e sobre espécies de <i>B. tenagophila</i> e <i>B. straminea</i> não infectadas, sujeitas ao extrato após 18 meses de armazenamento (E1 2024). Foram empregados 10 caramujos por ensaio .	51
Tabela 5 –	Efeito dos extratos de <i>Curcuma longa</i> sobre espécie não-alvo; <i>Poecilia reticulata</i> (guppy). Foram empregados 10 peixes por concentração.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DALY's	<i>Disability adjusted life Years</i> . (Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade)
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
ERO's	Espécies reativos a oxigênio
GBD	<i>Global Burden of Disease</i>
INPEG	Inquérito Nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthoses
OMS	Organização Mundial da Saúde
LPBM	Laboratório de Parasitologia e Biologia de Moluscos
UFC	Universidade Federal do Ceará
WASH	Water (água), Sanitation (saneamento) e Hygiene (higiene).
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Epidemiologia da esquistossomose no mundo.....	20
1.2	Epidemiologia da esquistossomose no Brasil.....	21
1.3	Controle da esquistossomose.....	24
1.4	Controle do hospedeiro intermediário.....	25
1.5	<i>Curcuma longa</i>.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivo específico.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Preparação dos extratos.....	36
4.2	Caracterização.....	36
4.2.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>.....	36
4.2.2	<i>Determinação de resíduo seco</i>.....	37
4.2.3	<i>Ensaio de solubilização em água</i>.....	37
4.2.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>.....	37
4.2.5	<i>Preparação da solução para ensaio de atividade moluscicida</i>.....	38
4.2.6	<i>Diluição dos extratos</i>.....	38
4.2.7	<i>Realização dos ensaios sobre efeito moluscicida</i>.....	39
4.2.8	<i>Ensaio sobre toxicidade em espécie não-alvo</i>.....	40
4.3	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Preparo do extrato.....	42
5.2	Caracterização.....	43
5.2.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>.....	43
5.2.2	<i>Determinação de resíduo seco</i>.....	44
5.2.3	<i>Ensaio de solubilização em água</i>.....	46
5.2.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>.....	47
5.2.5	<i>Preparação das soluções para ensaio do efeito moluscicida</i>.....	51
5.2.6	<i>Realização do ensaio sobre efeito moluscicida</i>.....	52

5.2.7	<i>Toxicidade sobre espécie não-alvo (Controle ambiental).....</i>	57
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	65
8	REFERÊNCIAS.....	66
9	ANEXO.....	76

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, como uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN), é uma das causas de maiores transtornos em todo o mundo, principalmente na África. Acarreta custos exacerbados anualmente a economia de diversos países, como consequência da pobreza e baixa qualidade em infraestrutura sanitária, havendo casos mais acentuados em países em desenvolvimento (emergentes), como o Brasil, por exemplo, além de outros países latinos. Fatores como saneamento básico precário são os principais na causa desta patologia (Who, 2019).

A esquistossomose está associada intimamente a pobreza e precária situação socioambiental, como saneamento inadequado, acarretando infecções em humanos e muitas vezes de forma recorrente, e consequentemente trazendo prejuízos que perduram por anos (Araújo *et al.*, 2007; Coura & Amaral, 2004).

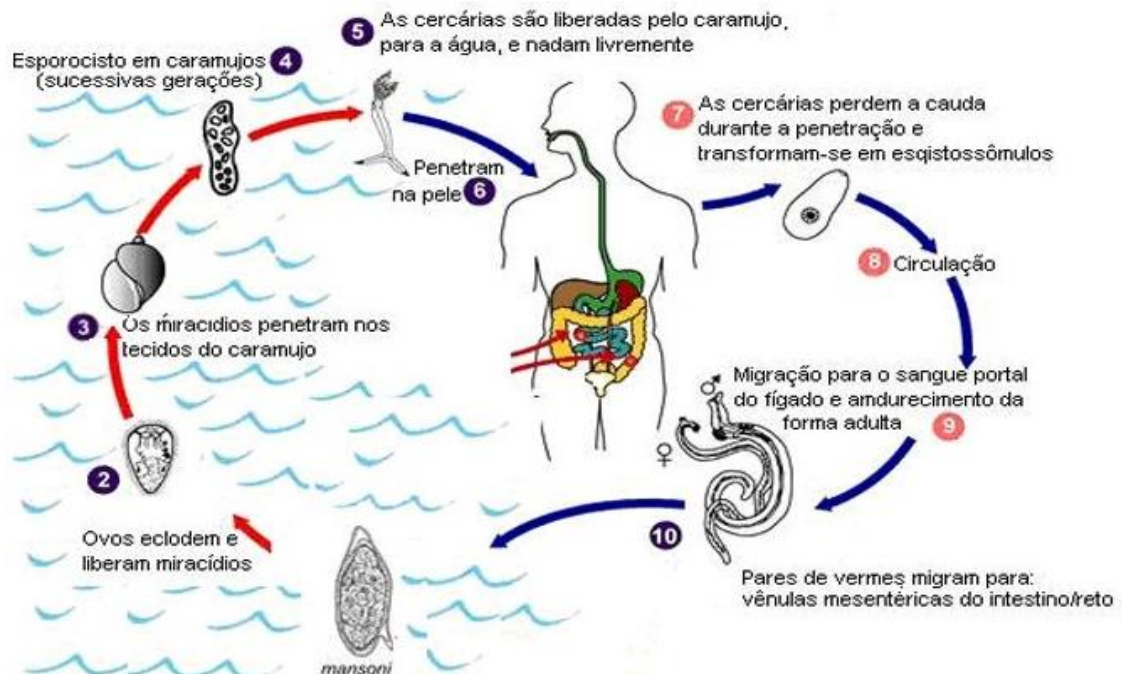
Também conhecida como bilharziose, a esquistossomose (CID 10: B65) é uma doença infecciosa e parasitária contraída a partir de água doce com presença da forma larval, a cercária, que é responsável pela infecção através da pele em seu hospedeiro definitivo, o homem (Brasil, 2014).

Os hospedeiros intermediários da Esquistossomose no Brasil são os moluscos do gênero *Biomphalaria*, (Mollusca: Pulmonata, Planorbidae). Das onze espécies reconhecidas, *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848), são encontradas infectadas naturalmente (Brasil, 2008). No entanto, a espécie de maior importância do ponto de vista epidemiológico é a *B. glabrata*. Ainda assim outra espécie como *B. straminea* é mais adaptada a variações climáticas (Brasil, 2014; Carvalho *et al.*, 2005).

O ciclo do trematoda depende do hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria* e do hospedeiro definitivo, o homem. Quando o indivíduo infectado, elimina os ovos de *S. mansoni* em suas fezes que, em contato com a água e em um ambiente adequado, eclodem, em forma de larva ciliada, os miracídios, que infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Nesta fase ocorre a forma assexuada com os esporocistos primários e secundários, sendo que, após quatro a sete semanas são eliminadas cercárias que ficarão livres e aptas a penetrar na pele do hospedeiro definitivo, o Homem, como pode ser observado na ilustração da figura 1, a seguir. Uma das principais manifestações após a penetração das cercarias é a chamada dermatite cercariana, com formas de erupções na pele, com duração de horas até semanas após o indivíduo ser exposto a ambiente, água infectada (CDC, 2012).

No ato de penetração, as cercárias perdem suas caudas bifurcadas e se transformam em esquistossômulos que irão através da circulação sanguínea para pontos diversos do organismo, mais especificamente para o fígado como órgão preferencial. No fígado ocorre a diferenciação do sistema reprodutor e amadurecimento sexual das formas jovens, a organogênese. Ao acasalar migram pela veia porta até o plexo mesentérico. Na região submucosa intestinal, nas vênulas, ocorre a postura dos ovos que logo irão para o lúmen do intestino grosso. O progressivo movimento e consequente migração dos ovos na parede do intestino provoca micro lesões, micro hemorragias, que consequentemente irá se manifestar como diarreia muco-sanguinolenta (Colley, 2014).

Figura 1 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Adaptado de Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), 2012.

A esquistossomose é classificada como aguda ou crônica. Durante a fase aguda podem ocorrer manifestações (sintomáticas) ou assintomáticas, podendo ser inclusive confundida com outras infecções parasitárias, apresentando alterações sugestivas em exames laboratoriais como eosinofilia e detecção de ovo em exame coproscópico (Sousa *et al.*, 2011). Durante a fase crônica a manifestação mais comum é a hepatoesplenomegalia e hipertensão portal (Andrade & Bina, 1985).

Os mecanismos patológicos da doença não estão relacionados diretamente ao verme, mas sim à reação do organismo à deposição de ovos e substâncias excretadas pelos vermes (Gryseels, 2012). Inflamação crônica imunomediada e induzida pela deposição dos ovos do parasito em tecido humano, que por um longo período desencadeia um processo de

fibrose tecidual, prejudicando a função orgânica, levando até a morte muitas vezes (Van Der Werf *et al.*, 2003).

Alguns ovos que são impedidos de ser eliminados ficam retidos na parede do intestino proporcionando uma reação imunopatológica e formação de pseudotumores (Sousa *et al.*, 2011). Diante destes fatores a reação imunopatológica, normalmente é de característica granulomatosa, proporcionando um processo inflamatório contínuo, levando a fibrose hepática, obstrução intestinal (Andrade & Peixoto, 1992).

A intensidade da infecção, está relacionada a carga parasitária, duração da infecção e resposta imunológica do indivíduo, compõe o padrão de morbidade da doença (Coelho *et al.*, 1996; Santos Souza & Andrade, 2000). A carga parasitária está relacionada intimamente com o grau de exposição do indivíduo a água contaminada, como consequência de fatores culturais e socioeconômicos no qual o indivíduo está incluído (Coura, Conceição & Pereira, 1984; Prata, 1991).

Diante destes pontos, o indivíduo acometido com a fase evoluída, crônica da esquistossomose, apresenta manifestações hepatoesplênicas e com complicações sofrem por incapacidade. Além destes aspectos há complicações de morbididades como: Anemia crônica, desnutrição e comprometimento cognitivo (King CH, 2005). Um indicador internacionalmente aceito e importante neste aspecto é o DALYs, do programa Global Burden of Disease (GBD).

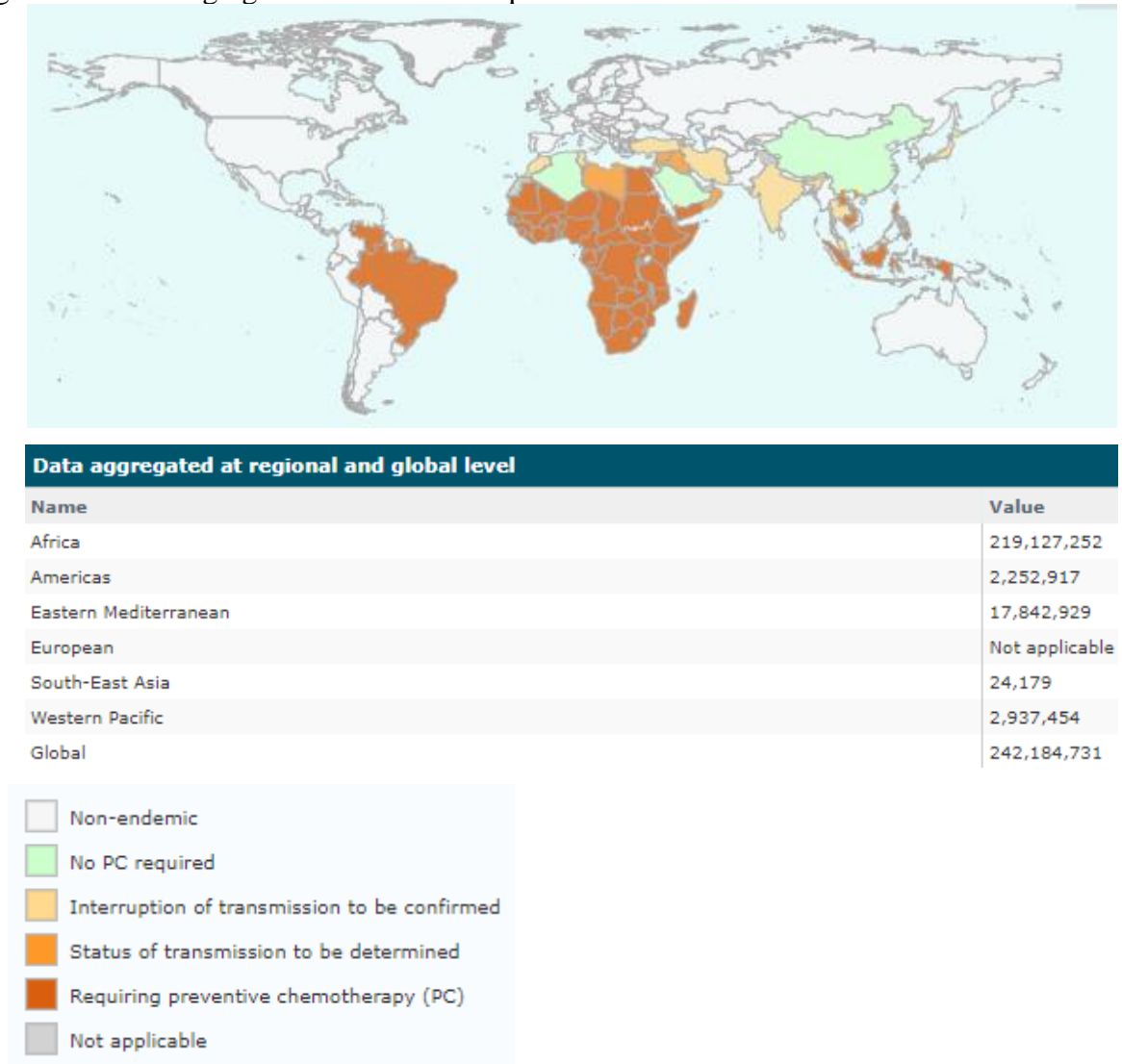
O indicador avalia o impacto na qualidade de vida do indivíduo afetado e os anos perdidos, deste, ajustados pela incapacidade, levando a prejuízos não só individuais, mas social e economicamente. A esquistossomose proporciona prejuízo como perda de anos de vida ajustado por incapacidade afetando diretamente a qualidade de vida e a economia (Hortez *et al.*, 2014).

1.1 Epidemiologia da Esquistossomose no Mundo

A esquistossomose é uma doença relacionada intimamente com fatores demográficos, como por exemplo a migração de pessoas para áreas urbanas, podendo introduzir essa parasitose em novas regiões, principalmente em áreas precárias de saneamento, sendo a baixa qualidade de tratamento de esgoto, a precariedade do sistema, um fator demasiadamente relevante que favorece a disseminação. Fatores climáticos, ambientais também podem ser favoráveis, além da questão econômica que é afetada diretamente, com a doença proporcionando prejuízos a economia e ao indivíduo ativo, como medido no indicador DALY's. Todos estes aspectos são refletidos socialmente (Bruun & Aagaard-Hansen, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a situação de pessoas afetadas em todo o mundo é de 242 milhões de pessoas, dados atualizados em 2020, sendo nas américas mais de 2 milhões de pessoas (WHO, 2020).

Figura 2 – Dados agregados de casos da Esquistossomose no Mundo.



Fonte: WHO, 2020 com adaptações.

1.2 Epidemiologia da Esquistossomose no Brasil

O Brasil como país em desenvolvimento, contribui intensamente com os índices de doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2019). A precariedade no que diz respeito a qualidade de água, abastecimento, saneamento básico, corrobora com os números. Desta forma, há uma contribuição por parte do Brasil em notificações de casos de esquistossomose, onde na América Latina, Caribe, chega a 96% de casos (Hotez; Fujiwara., 2014).

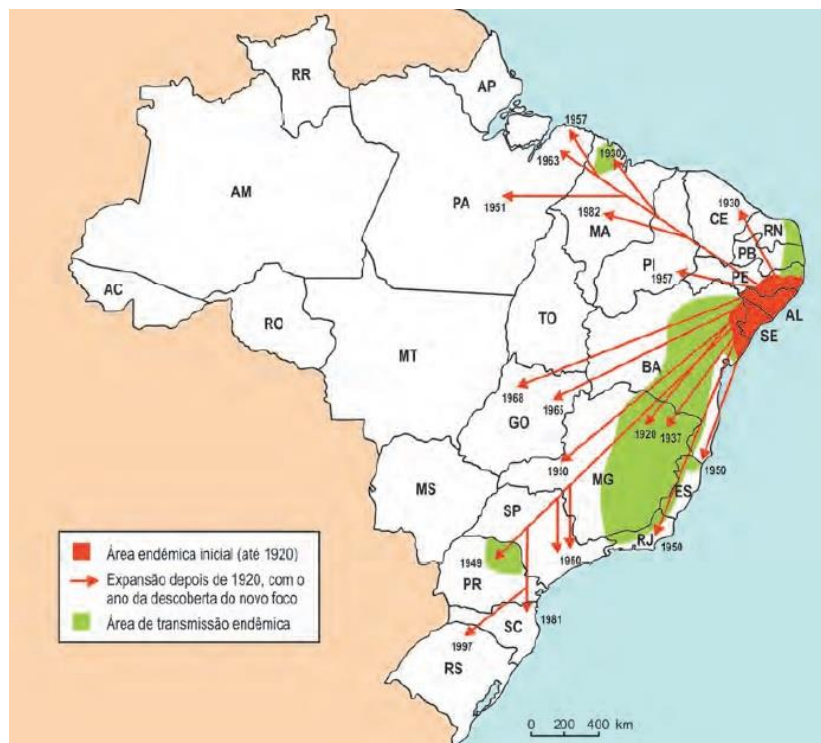
Além destes fatores, no Brasil, a esquistossomose é a segunda maior causa de mortes relacionadas a doenças tropicais negligenciadas, dados estes obtidos em um estudo durante doze anos (2000-2011), ficando atrás apenas dos casos de doença de Chagas (Martins-Melo *et al.*, 2016). Também foi possível observar que as maiores taxas de mortalidade são provenientes da região nordeste do Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2014).

O Brasil possui uma relevante contribuição no que diz respeito as taxas de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), principalmente esquistossomose (96%), Leishmaniose visceral (93%), Hanseníase (86%), casos de arboviroses como dengue (40%), Leishmaniose cutânea (39%) e doença de Chagas (25%) (Hotez e Fujiwara., 2014).

Historicamente no Brasil a esquistossomose primeiramente esteve relacionada ao tráfico de escravos vindos da África, muitos destes acometidos pela doença e se instalando em regiões litorâneas de Recife e Salvador, trabalhando em lavouras de cana-de-açúcar e posteriormente se deslocando para o interior em rotas migratórias relacionadas a novos ciclos econômicos, como de pedras preciosas, criação de gado, ciclo da borracha e industrialização (Brasil, 2014).

Fatores importantes como a questão agrícola dependente do abastecimento hídrico corresponde a um ponto importante de influência na disseminação da doença no país, principalmente quando estabelecido de forma inadequada, precária. Associado a pobreza, fluxo migratório, hábitos inadequados humanos, são os fatores associados que favorecem ao desenvolvimento do hospedeiro intermediário e propagação da esquistossomose, como ilustrado na figura 3 (Brasil, 2008).

Figura 3 – Ilustração das áreas endêmicas para Esquistossomose no Brasil, do início à expansão e transmissão endêmica.

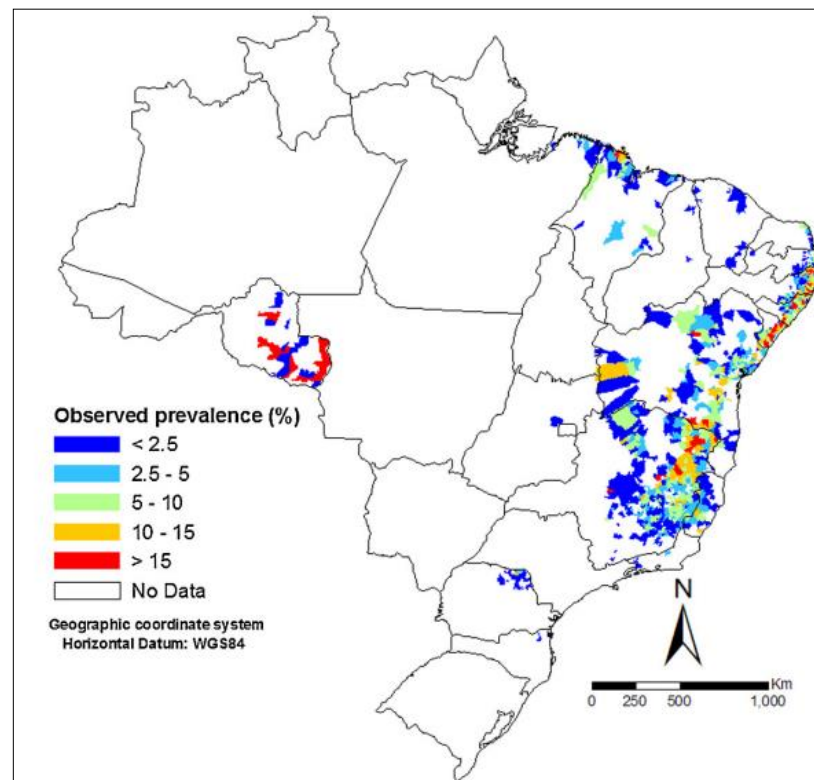


Fonte: BRASIL, 2014b, adaptado por Heloisa M. N. Diniz do mapa original publicado em BRASIL, 1998.

Existem cerca de 1,5 milhões de pessoas infectadas por *S. mansoni* no Brasil, segundo estudo levantado pelo Ministério da Saúde através do Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e geo-helmintoses, INPEG, entre os anos de 2011 e 2014, sendo o Estado de Sergipe o de maior índice de positividade com 8,1%, seguindo de Minas Gerais (3,8%), Alagoas (2,3%), Bahia (2,1%), Pernambuco (2,1%), Rio de Janeiro (1,6%) (Katz *et al.*, 2014) e no Ceará segundo o sistema de informação do programa de vigilância e controle da esquistossomose, SISPCE, a taxa de positividade em 2015 foi de 0,75 % (Sesa-CE, 2016) como pode ser observado na figura 4 a seguir.

Os estados de Sergipe, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Pernambuco são os principais estados endêmicos para esquistossomose, sendo o estado do Ceará, Distrito Federal, Maranhão, Pará, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e São Paulo as regiões com casos de foco para esquistossomose (Brasil, 2014). As macrorregiões mais significativas relacionadas a taxa de positividade para esquistossomose correspondem as regiões Sudeste e Nordeste, com 2,35 e 1,27, respectivamente, no que diz respeito a proporção de casos positivos estratificados em municípios em regiões endêmicas e não endêmicas, com mais ou menos 500 mil habitantes. (Katz *et al.*, 2017).

Figura 4 – Áreas endêmicas para Esquistossomose.



Fonte: SCHOLTE *et al.*, 2014.

1.3 Controle da Esquistossomose

Inicialmente, nos anos 2000 o controle e combate a esquistossomose estava focada apenas no controle da carga de morbidade, no entanto em países como o Brasil, Camboja, China, Egito, Marrocos e Uganda, realizavam além disso, o controle da população de caramujos através de moluscicidas, manejo ambiental, tratamento em massa da população afetada e com isto obteve uma redução significativa em relação a prevalência de infecção (WHO, 2001).

O controle com ênfase na transmissão da esquistossomose ocorreu até meados da década de 70. Com o advento da quimioterapia, a partir da década de 80, o foco passa a ser o controle da morbidade, através de drogas eficazes, seguras e de baixo custo, sendo este último um fator primordial, uma vez que a doença afeta populações em áreas de vulnerabilidade social e sanitária. A estratégia atualmente para controle se baseia na combinação de medidas preventivas através da educação em saúde, saneamento e quimioterapia em massa (Amaral *et al.*, 2008).

O tratamento em massa (quimioterapia em massa) reduz significativamente a morbidade, no entanto a eliminação requer medidas mais complexas. Para isso é necessário um conjunto de fatores, combinação de estratégias integradas, como controle da população de

caramujos, tratamento de água eficaz, saneamento básico efetivo, além de educação em saúde, proporcionando assim mudança de hábitos que possam representar riscos para populações vulneráveis (WHO, 2022).

No Brasil, o programa de controle da esquistossomose, através do governo, foi implementado em 1975, denominado de Programa Especial de Controle a Esquistossomose (PECE), pela Superintendência de campanha de Saúde Pública, (SUCAM), visava principalmente o levantamento de informações locais, como censo geográfico, condições sanitárias, levantamento malacológico, aplicação de moluscidas em locais hídricos e avaliação do impacto epidemiológico (Machado, 1982).

Em 2010, foi aprovado pelo Governo Federal o Inquérito Nacional de Prevalência da esquistossomose e Geo-helminthoses, o INPEG, através da mobilização de Katz e Almeida diante da necessidade de avaliação da doença no Brasil, avaliando o aspecto amostral da esquistossomose no país, além de avaliar também a prevalência de ascaridíase, tricuriase e ancilostomíase em crianças (Katz e Peixoto, 2000). No ano de 2014 a esquistossomose passou a ser uma doença de notificação compulsória em áreas não endêmicas, através do decreto da portaria 1.271, da secretaria de vigilância em saúde, do Ministério da Saúde, Governo Federal (Brasil, 2014b).

1.4 Controle do hospedeiro intermediário.

Apesar de esforços de órgãos governamentais para controle da doença, milhões são afetados e vivem em áreas endêmicas. O *Schistosoma mansoni* em seu ciclo, necessita de um hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria* e o controle da população de caramujos através de moluscidas são medidas auxiliares no combate a esquistossomose de forma integrada sendo uma estratégia para conter o avanço e novas infecções de indivíduos vulneráveis (Ritchie, 1973).

O controle da população de hospedeiros intermediários da esquistossomose é indicado como forma complementar na estratégia de controle da doença e em casos específicos, como em regiões de alta prevalência, casos agudos e com focos. Os métodos de controle são classificados em biológicos, físicos e químicos (Amaral *et al.*, 2008).

O método de controle biológico é realizado através de agentes competidores, controladores de populações de planorbídeos, como outros moluscos, por exemplo e até emprego de peixes como predadores, como tilápia *Oreochromis niloticus*. A desvantagem deste método consiste, dentre os mais importantes, na introdução de espécies exóticas que podem

alterar a biodiversidade local e algumas espécies de moluscos que podem coexistir com planorbídeos, tornando esta via ineficaz. (Amaral *et al.*, 2008).

O método de controle físico consiste em aplicações de melhorias em saneamento hídrico como canalização, drenagem e manejo ambiental para eliminação de vetores em criadouros. Este meio era o único possível, durante a década de 50, quando os compostos químicos com ação moluscicida eram limitados e não específicos (Amaral *et al.*, 2008).

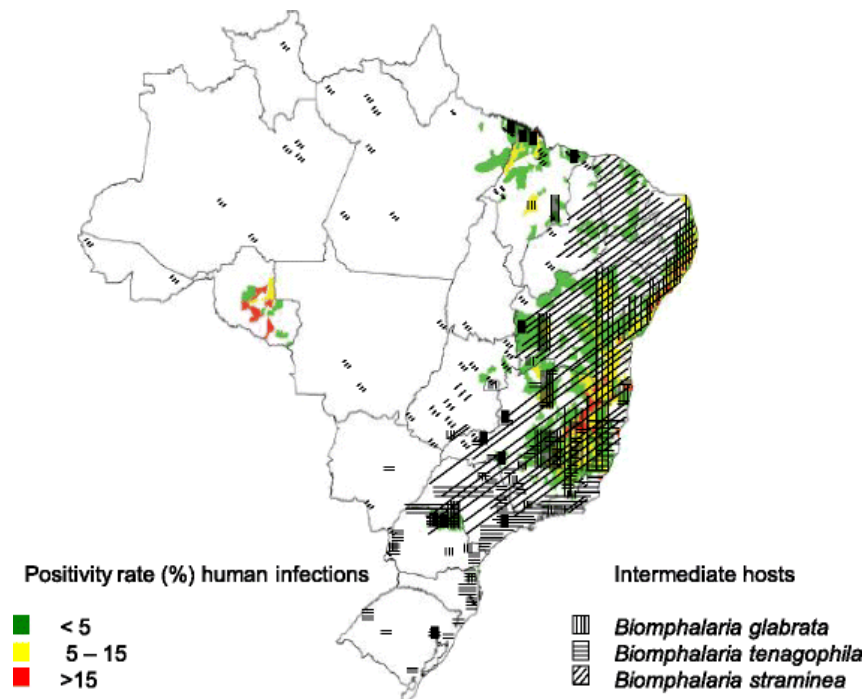
O controle químico através de aplicação de substância com potencial moluscicida, ocorre mediante o planejamento e análise de atividade malacológica e sua localidade de acordo com as exigências da legislação ambiental. Os moluscicidas são compostos capazes de matar moluscos, e para que se classifique como tal, a substância deve possuir características como: baixo custo, eficácia em baixas concentrações, não tóxico ao homem e não deve ter efeitos acumulativos teciduais, além de não alterar significativamente a biodiversidade local (Amaral *et al.*, 2008).

Entre os anos de 1946 e 1955 mais de 7.000 substâncias químicas foram testadas quanto ao efeito moluscicida. A niclosamida é a mais conhecida e utilizada até hoje no controle da população de caramujos do gênero *Biomphalaria*, sendo este, recomendado pela Organização Mundial da Saúde, OMS (Perrett, Whitfield, 1996).

É importante salientar a existência de alguns fatores que dificultam o controle da população de caramujos, como por exemplo, sua capacidade adaptativa, alta taxa de reprodução, que é dependente de fatores ecológicos intrínsecos da região que habitam, relacionados a postura de ovos e a viabilidade destes (Paraense, 1955), também a alta proliferação e resistência a dessecação lenta, podendo sobreviver por mais de 6 meses (Barbosa, 1958), além de estar presente desde o período Jurássico, segundo registros geológicos na Europa e EUA (Baker, 1945). É de extrema importância o conhecimento destes aspectos para se obter uma visão ampla da esquistossomose e de sua problemática além das características epidemiológicas de acordo com cada região (Magalhães, 1970).

Além disso, a transmissão está relacionada diretamente com a espécie de *Biomphalaria* e com o grau de compatibilidade desta espécie com a cepa de *Schistosoma mansoni* (Magalhães, 1970). No Brasil, existem 11 espécies de *Biomphalaria*, sendo a *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, as espécies que mantêm o ciclo de *S. mansoni* nos vários estados do país (Paraense, 2001), com variação da taxa de positividade (Ministério da Saúde, 2014), sendo possível observar a presença dessas espécies através da ilustração da figura 5 a seguir.

Figura 5 – Mapa ilustrativo referente a presença das três principais espécies do gênero *Biomphalaria* no Brasil.



Fonte: Brasil, Ministério da saúde, 2014.

No que diz respeito ao controle e tratamento da esquistossomose no Brasil e no mundo a OMS recomenda o uso de moluscicidas e quimioterapia em massa da população infectada. Essa medida tem proporcionado bons resultados no que diz respeito à diminuição das morbidades (WHO, 2022). O uso da niclosamida, como moluscicida mais conhecido e recomendado pela OMS foi descontinuado em 2002 diante dos problemas e desequilíbrios ambientais no ecossistema aquáticos proporcionados por substâncias sintéticas com propriedades moluscicidas (Coelho & Caldeira, 2016).

A niclosamida, um moluscicida disponível e recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) possui alto custo e logística complexa e inviável, além disso, o produto é pouco estável frente a luminosidade e tóxico para animais co-habitantes e plantas submersas. Por este motivo há uma busca intensa por moluscicidas não sintéticos, ou seja, obtenção de forma natural como na flora em geral, o que se torna viável pelo baixo custo, produto alternativo, específico e seguro (Vasconcellos *et al.*, 2005), além disso 30% das drogas no mundo são obtidas de forma direta ou indireta de plantas (Koehn & Carter, 2005).

Desde 1986 até 2001 a aplicação da niclosamida tem diminuído, sendo que em 2002 a OMS não obteve mais dados sobre o uso deste moluscicida no Brasil, sendo que os únicos dados no país são referentes à aplicação em estados do Nordeste brasileiro, como: Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas e Sergipe (Barbosa, 2008).

A aplicação mensal de moluscicida em longa duração se mostrou eficaz no que diz respeito a diminuição da prevalência da esquistossomose como medida única, segundo estudo realizado por Barbosa e Costa. Houve resultado semelhante em região endêmica do Nordeste brasileiro segundo Pieri *et al.*, 1995. Os moluscicidas sintéticos possuem algumas desvantagens como ação letal em outros organismos (WHO, 1992), exigir aplicação frequente (Coura Filho, 1992) e a questão custo-efetivo (Coura, 1995).

Diante da problemática da esquistossomose, estudos vêm sendo realizados com o interesse no desenvolvimento de drogas moluscicidas de origem vegetal, biodegradável, que possam constituir uma alternativa para o controle da população de caramujos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, e consequentemente, na redução da esquistossomose, além de não afetar espécies não-alvo e o meio ambiente (Cantanhede *et al.*, 2010).

A atividade de algumas espécies vegetais, foram testadas frente aos moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* com resultados promissores, dentre estas estão o caule de *Sejania sp* (cipó-timbó) e frutos de *Sapindus saponária L.* (saboneteira) (Ribeiro, 2016), *Annona muricata* e *Jatropha elliptica* (Rocha *et al.*, 2013), folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) (Leyton *et al.*, 2005), *Byrsonima intermedia* Juss A. (Malpighiaceae) (Alves *et al.*, 2000), *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (NE Br.) Urach & Leandri (Euphorbiaceae) (Schall *et al.*, 2001), *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze (Lamiaceae) (Menezes *et al.*, 1999), *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez (Lauraceae) (Coutinho *et al.*, 2007), e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) (Bezerra *et al.*, 2002) e em extratos de cúrcuma (*Curcuma longa L.*, Zingiberaceae) (Silva Filho *et al.*, 2009).

O extrato, obtido a partir do pó do rizoma de *Curcuma longa*, cujas propriedades anti-helmínticas já são conhecidas, além de antioxidante e anti-inflamatória, proporcionadas por compostos fenólicos naturais da planta, pode ser um importante aliado no combate ao avanço, prevalência e incidência da esquistossomose (Araújo & Leon, 2001).

1.5 *Curcuma longa*

Desde a antiguidade a humanidade utiliza técnicas empíricas para aliviar, curar enfermidades, como por exemplo através do uso de vegetais como medicamento (Lameira, 2008). Desde então, mais recentemente, nas últimas décadas tem se aprofundado através de estudos, buscando compreender melhor os mecanismos de ação, princípios ativos de certas substâncias naturais no tratamento de algumas doenças, aliviando sintomas e até no combate efetivo da patologia o que proporciona destaque destes compostos e suas aplicações (Goel *et*

al., 2008).

O uso de moléculas isoladas só foi possível a partir do século XIX, como aplicação de fármacos, proporcionando alternativas ao uso de produtos naturais (Crag *et al.*, 2012). Deste modo, o isolamento da curcumina, realizado em 1815 por Vogel, essa tem se destacado em pesquisas por suas características, propriedades biológicas e químicas, além da variada aplicação deste produto natural (Jasim, 1989).

A *Curcuma longa* L. conhecida como açafrão da Índia e internacionalmente como “turmeric” pertencente à família *Zingiberaceae*, proporciona variadas aplicações, desde a culinária, indústria têxtil e na saúde por suas diversas propriedades químicas, bioquímicas, podendo citar algumas, como: antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-helmíntico e antifúngico (Naksuriya *et al.*, 2014).

O potencial antioxidante é, dentre os demais, o mais reconhecido. A *Curcuma longa* é a segunda colocada com potencial antioxidante e que essa propriedade se deve aos pigmentos presentes no rizoma, segundo estudo realizado por Ramaswamy & Banerjee (1948). A atividade antioxidante está relacionada a capacidade de doação de hidrogênio presente na estrutura molecular que interage com agentes reativos a oxigênio (Ross *et al.*, 2000).

Os pigmentos fenólicos mais presentes no rizoma, são os pigmentos que proporcionam aplicação também na indústria têxtil como corantes naturais, uma vez que pigmentos sintéticos foram proibidos em alguns países da América do norte (Maia, 1991; Rusig & Martins, 1992). Estes fatores e características organolépticas do rizoma podem proporcionar estudos em áreas diversas por suas variadas aplicações, como produção de óleos essenciais e extratos (Duarte *et al.*, 1989).

No Brasil é comumente confundida com outra espécie, a *Crocus sativus* L. também denominada de açafrão, sendo comum as denominações por regionalização, como por exemplo: açafrão-da-terra, batatinha amarela, gengibre dourada, mangarataia (Maia *et al.*, 1995). A produção de açafrão no Brasil possui pequena expressão econômica, no entanto Mara Rosa, no estado de Goiás, é referência na produção e distribuição do material para indústria alimentícia e de corantes, por sua produção comercial que atinge 150 hectares e produtividade média de 12 toneladas por hectare (Açafrão, 1994).

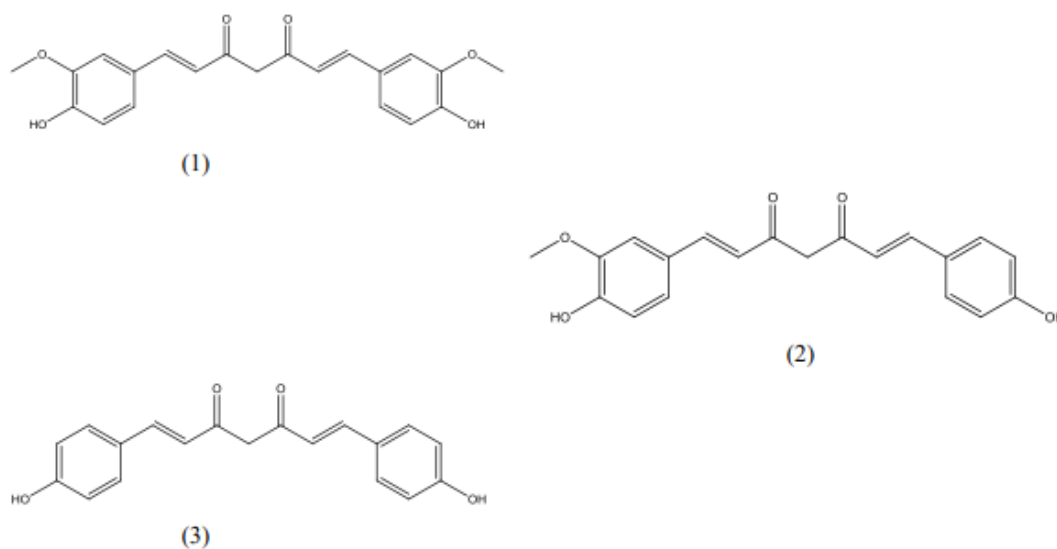
No que diz respeito às características, a *Curcuma longa* é originária da Ásia, região sudoeste, especificamente na Índia, onde pode ser encontrada nas encostas das florestas tropicais, sendo uma planta herbácea e perene e normalmente em condições favoráveis, pode atingir de 120 a 150 cm de altura. Suas folhas têm forma oblonga-lanceolada, o rizoma central é periforme, arredondado ou ovóide e pode apresentar algumas ramificações nas laterais

(Hertwig, 1986).

O interesse nos aspectos constitucionais da *Curcuma longa* e suas aplicações estão concentrados nos rizomas da planta por sua variedade de compostos químicos, como valor energético (Harris *et al.*, 1968) e quantidade de proteínas (Souza *et al.*, 1993), além de compostos corantes e óleos essenciais (Govindarajan, 1980).

Quanto a curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) está mais presente no rizoma e sua concentração varia de 2,8 a 8% segundo Govindarajan (1980). É possível observar na figura 6 a seguir os três compostos corantes principais de *C. longa*, que são os seguintes: I) curcumina; 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; II) demetóxicurcumina, 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; III) bisdemetóxicurcumina, 1,7-bis (4-hidroxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona. Esses compostos podem apresentar-se em quantidades variadas no rizoma, segundo Rusig & Martins (1992) e por apresentar um espectro de absorção de baixa variação (420 – 425 nanômetros), tornou-se viável e prático denominar estes três compostos de mesma cor, de curcuminóides.

Figura 6 – Representação gráfica dos três compostos corantes da *Curcuma longa*: 1) Curcumina, 2) Demetóxicurcumina e 3) Bisdemetóxicurcumina.



Fonte: Kim HJ, 2009.

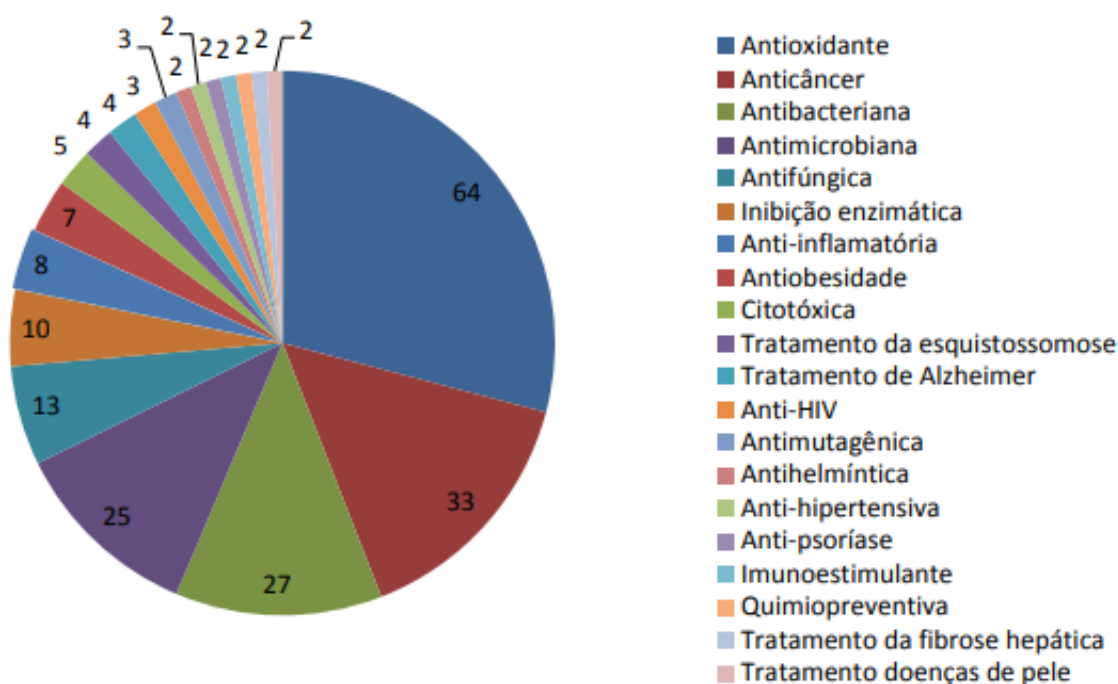
Um dos fatores relacionados a aplicação clínica da *Curcuma longa* está na sua baixa biodisponibilidade, uma vez que esta possui baixa solubilidade em água, o que dificulta sua absorção e aplicação *in vivo*. Os compostos sofrem diretamente com a ação metabólica hepática em sua primeira passagem pelo organismo, logo o tipo de metabolismo envolvido e sua ação está diretamente relacionada a via de administração (Anand *et al.*, 2008).

O açafrão, a partir do rizoma de *Curcuma longa*, demonstrou proporcionar variados efeitos farmacológicos como por exemplo, anti-inflamatório, antioxidante além do efeito antiparasitário contra protozoários: *Trypanosoma brucei* (Nose *et al.*, 1998), *Giardia lamblia* (Pérez-Arriaga *et al.*, 2006), *Leishmania donovani* (Cheikh-Ali *et al.*, 2015) e efeito esquistossomicida.

A investigação de efeito antiparasitário de plantas é uma estratégia válida para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente na busca de atividade química e biológica contra doenças tropicais negligenciadas, como a esquistossomose (Ndjonka *et al.*, 2013). A curcumina, sendo um composto derivado da *Curcuma longa*, possui atividades variadas, principalmente contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro* (Magalhães *et al.*, 2009).

Na figura 7, adiante pode ser observada a proporção de citações relacionadas aos efeitos (*in vitro*) da *Curcuma longa* e seus derivados.

Figura 7 – Número de citações relacionadas às atividades *in vitro* demonstradas para droga vegetal e derivados de *Curcuma longa*, bem como para substâncias isoladas da planta e produtos naturais.



Fonte: Monografia espécie *Curcuma longa* L. Ministério da Saúde, Anvisa, 2012.

A curcumina pode atuar regulando a expressão de cerca de 2.374 genes que são responsáveis por regular, por exemplo, a caspase 8 (*SmCASP8*), responsável pelo mecanismo de apoptose (Morais *et al.*, 2013). Além deste fator pode também gerar espécies reativas a

oxigênio (ERO's), que induz a morte programada, apoptose, em nematóides como *Setaria cervi* e *S. digitata* (Mohapatra *et al.*, 2011).

O uso da *Curcuma longa* como alternativa para controle da população de hospedeiro intermediário da esquistossomose, como estratégia para minimizar exposição e riscos de infecção é válido, uma vez que não há vacina eficaz disponível. O tratamento é realizado através de medicamento como Praziquantel. No entanto, a resistência a este fármaco é uma preocupação (Wang *et al.*, 2012), sendo necessário medidas de controle da doença e do hospedeiro intermediário, com foco em estratégias quimioterápicas alternativas e sustentáveis, sendo as plantas o foco como fonte de princípios ativos naturais, principalmente com efeitos antiparasitários (Al-Sayed *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade de intervenção estratégica para combater os casos de esquistossomose no Brasil e no mundo, especialmente em áreas endêmicas, o foco do presente estudo é avaliar a ação do extrato de *Curcuma longa* que possa agir através da ação moluscicida contra o hospedeiro intermediário da esquistossomose, os moluscos do gênero *Biomphalaria*, sendo este o principal hospedeiro da esquistossomose no Brasil e América do Sul (Alves *et al.*, 2000).

Como uma das estratégias de controle da esquistossomose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda, além da quimioterapia em massa e preventiva através da administração de Praziquantel, educação em saúde sanitária como acesso a água potável, saneamento e controle da população de moluscos hospedeiros intermediários, com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão, com aplicação de métodos biológicos, ambientais e químicos, através de substâncias com ação moluscicida, dentre outros (WHO, 2022).

A única substância recomendada pela OMS e utilizada para controle da população de moluscos, hospedeiros intermediários da esquistossomose, é a Niclosamida, um moluscicida sintético, que devido sua baixa seletividade proporciona efeitos diversos e letais para demais espécies, além de contaminar o meio ambiente e alta resistência desenvolvida pelos moluscos (Costa *et al.*, 2015; Rangel *et al.*, 2022).

Além dos fatores deletérios para o ecossistema local supracitado, a aplicação deste moluscicida sintético em áreas extensas além da logística para transporte, torna o processo insatisfatório, inviável e de alto custo, principalmente no que diz respeito a aplicação em áreas complexas como rurais por exemplo, tornando necessário investimentos em pesquisa com objetivo de identificar moluscicidas naturais, de baixo custo, como alternativa viável para controle da população desses moluscos (Ministério da Saúde, 2008).

O açafrão proporciona efeitos farmacológicos como: anti-inflamatório, antioxidante e antiparasitário agindo principalmente contra vermes adultos de *S. mansoni* (Magalhães *et al.*, 2009) tendo como mecanismo de ação a indução de agentes reativos de oxigênio que induzem a apoptose (Moraes *et al.*, 2013). O composto majoritário do extrato, a curcumina, é responsável pela ação antiparasitária e moluscicida como demonstrou Silva Filho *et al.*, (2009) sendo, portanto, um composto de interesse utilizado neste estudo para avaliação de seus efeitos.

Diante destes fatos, há a necessidade de buscar compostos naturais, biodegradáveis, seletivos que tenham ação sobre o hospedeiro intermediário, os moluscos do gênero *Biomphalaria*, além de não afetar demais espécies não-alvo e o meio ambiente em geral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial moluscicida dos extratos de *Curcuma longa* em caramujos do gênero *Biomphalaria*.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar extratos de *Curcuma longa*
- Avaliar o efeito moluscicida dos extratos de *Curcuma longa* em caramujos *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni*;
- Avaliar o potencial moluscicida do extrato de *Curcuma longa* em *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, não infectados;
- Avaliar as diferenças de potencial de ação entre os extratos: etanólico e acetônico de *Curcuma longa* nos moluscos acima citados;
- Avaliar a persistência do efeito moluscicida dos extratos em relação ao tempo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos

A matéria-prima vegetal utilizada no preparo dos extratos foi o pó dessecado da espécie *Curcuma longa* L, obtido a partir do rizoma do vegetal previamente processado no local no qual foi obtido, cooperativa dos produtores de açafrão, na cidade de Mara Rosa, no estado de Goiás, Brasil.

Para cada solvente, álcool e acetona, empregados na técnica foram utilizadas 200g do material vegetal em pó, macerado e seguido de percolação lenta até obtenção de 1.000 ml dos dois extratos na proporção droga: solvente 1:5.

Após a obtenção, os extratos brutos foram armazenados em frasco de vidro âmbar, com capacidade de 1.000 ml em temperatura ambiente, aproximadamente 27°C, no laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará, UFC.

4.2 Caracterização

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Placas de sílica gel GF254 em suportes de alumínio foram previamente ativadas em estufa a 60 °C durante 5 minutos. 10 µL de cada um dos extratos foram aplicados e, depois de deixado evaporar os solventes, colocadas em cuba saturada com os respectivos solventes para eluição citados na tabela 1. Após a eluição, as placas foram retiradas, a altura do solvente marcada, e deixadas secar ao ar. Em seguida foram reveladas como descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Condições utilizadas nos ensaios dos extratos por CCD

Classe do Farmacógeno	Eluente	Revelador
Terpenos	Tolueno:Acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica e aquecimento a 100 °C
Pigmentos	Clorofórmio:Ácido acético glacial:Água (95:5:1)	Visível, UV 254 e UV 365nm

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Determinação do resíduo seco

O resíduo seco de cada um dos extratos foi determinado como descrito na farmacopeia brasileira 6ª Ed, 2022. 10 mL de cada extrato foi colocado em cápsulas de porcelana previamente pesadas. As cápsulas foram então submetidas à evaporação em estufa, inicialmente a 50°C e, posteriormente, a 105°C até peso constante. A massa de resíduo seco foi utilizada para calcular e expressar o resultado de forma percentual. O processo foi realizado em triplicata e repetido após 18 meses para avaliação do extrato aplicando análise de variância para verificação da estabilidade dos extratos em relação ao tempo.

4.2.3 Ensaio de solubilização em água

Foi realizado ensaio de solubilização dos extratos em água para avaliar a necessidade do uso de tensoativo. Foi utilizado o volume de 1 ml de cada um dos extratos e 10 ml de água deionizada em tubos de ensaio de vidro. Ao observar a turbidez, passou-se a acrescentar polisorbato 80, agitando em vortex após cada adição, até que o líquido se apresentasse límpido.

4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos foram avaliados quanto aos seus componentes corantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE = HPLC), realizada em equipamento Shimadzu contendo degaseificador, bomba, detector UV/Vis, forno de coluna, injetor manual com loop de 20 microlitros, controlador e software. Coluna de fase reversa C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm, partículas de 5 micrômetros. A fase móvel foi composta da mistura desgaseificada de acetonitrila:ácido acético 1 % (55:45), com pH ajustado para 4,4 com solução de hidróxido de sódio 1M. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de 425 e 254 nm, com injeção de 20 microlitros da amostra obtida na proporção de 1:50 em fase móvel. As análises foram realizadas em 2022 e 2024. Os resultados foram comparados com aplicação de teste t para verificação da estabilidade dos extratos em relação ao tempo e sua composição.

4.2.5 Preparação das soluções para ensaio da atividade moluscicida

Para realização do experimento, foram preparadas soluções do extrato de *Curcuma longa* na concentração de 100 ppm, expressa a partir dos dados do resíduo seco, sendo depois diluída para 10 ppm, 5 ppm e 1 ppm, para aplicação e exposição dos caramujos do gênero *Biomphalaria* na avaliação do seu efeito moluscicida.

Para ambas as soluções foi adicionado tensoativo Polisorbato-80 (Tween-80) para solubilização em água destilada, utilizada na preparação da solução de 100 ppm. Foi realizada a adição gradativa do tensoativo na solução observando a turbidez e sua gradativa diminuição.

Foram preparadas as respectivas soluções e utilizada a solução sem solvente orgânico residual para os ensaios. Para eliminação residual dos solventes orgânicos, os extratos foram colocados em cápsulas de porcelana e submetidos a evaporação em estufa de secagem a 50 °C. Após secagem, ao resíduo obtido foi adicionado tensoativo e água destilada aos poucos, até homogeneização. Após isto, transferido para balão volumétrico com capacidade de 1.000ml e completado o volume até o menisco com água destilada.

Preparadas as respectivas soluções de 100 ppm do extrato etanólico e acetônico com volume de 1 litro, foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e identificados, posteriormente armazenados em geladeira a temperatura abaixo de 4°C.

Os caramujos *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados utilizados neste experimento foram mantidos no moluscário do instituto René Rachou, da Fiocruz, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, além dos caramujos não infectados *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*. Estes, são mantidos em aquários de vidro, com água desclorada, com controle de pH. Os caramujos são alimentados com frequência e sua manutenção realizada periodicamente com troca de água e verificação do pH, com adição moderada de carbonato de cálcio (CaCO₃).

4.2.6 Diluição dos extratos

A diluição foi realizada a partir da solução padrão de 100 ppm dos extratos à base de etanol e acetona, para 10, 5 e 1 ppm. Para o preparo da solução de 10 ppm, 25 mL da solução de 100 ppm foram diluídos com água destilada até o volume de 250 mL. Para solução de 5 ppm, 12,5 mL da solução de 100 ppm foram diluídos com água destilada até o volume de 250 mL, seguindo o protocolo também para 1 ppm, para ambos os extratos, etanólico e acetônico. A

avaliação moluscicida foi realizada no instituto René Rachou, na Fiocruz, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4.2.7 Realização dos ensaios do efeito moluscicida.

Foram preparados dois grupos, utilizando-se 4 béqueres para cada grupo, sendo três para concentrações de 10, 5 e 1 ppm e 1 para grupo controle, correspondente ao extrato etanólico e outros 4 grupos correspondentes ao extrato acetônico. Foram utilizadas placas de Petri de 60 x 15 mm, 8 (oito) unidades, 4 para cada grupo de extrato para colocar os moluscos após finalização do ensaio e contabilização da mortalidade. Os materiais e vidrarias utilizados foram devidamente higienizados antes do ensaio.

Para o ensaio com *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados, foram selecionados 80 caramujos, devidamente separados e colocados 10 caramujos em cada um dos quatro béqueres dos grupos referentes aos extratos à base de etanol e acetona, em 10, 5 e 1 ppm de cada, além de água desclorada como controle, totalizando 40 caramujos expostos ao grupo do extrato etanólico e 40, referentes ao grupo expostos ao extrato acetônico. Foram expostos durante 24, 48, 72, 96 e 168 horas. Após exposição foi contabilizada a mortalidade e os sobreviventes foram sacrificados, incluindo os do grupo controle.

Os experimentos foram realizados logo após a preparação do extrato (E1) que foram mantidos refrigerados em frascos de vidro e repetido o mesmo protocolo experimental após 18 meses com os mesmos extratos (E1), com objetivo de comparar a manutenção da atividade moluscicida do extrato. Foi preparada nova diluição (E2) a partir dos extratos obtidos 18 meses antes e repetido os experimentos com o objetivo de avaliar estabilidade do extrato percolado.

Os moluscos foram expostos a soluções teste dos extratos e permaneceram por 24 horas. Após este período foram retirados, lavados em água corrente, colocados em água desclorada sendo realizada a contabilidade e registro de sobreviventes e retirados os mortos. Os sobreviventes foram alimentados com alface fresca onde permaneceram por mais 24 horas. Foi realizado este procedimento por 72 e 96 horas e registro final após 168 horas. O grupo controle seguiu a mesma metodologia, exceto na primeira etapa onde permaneceram em água desclorada.

4.2.8 Ensaio sobre toxicidade em espécies não-alvo.

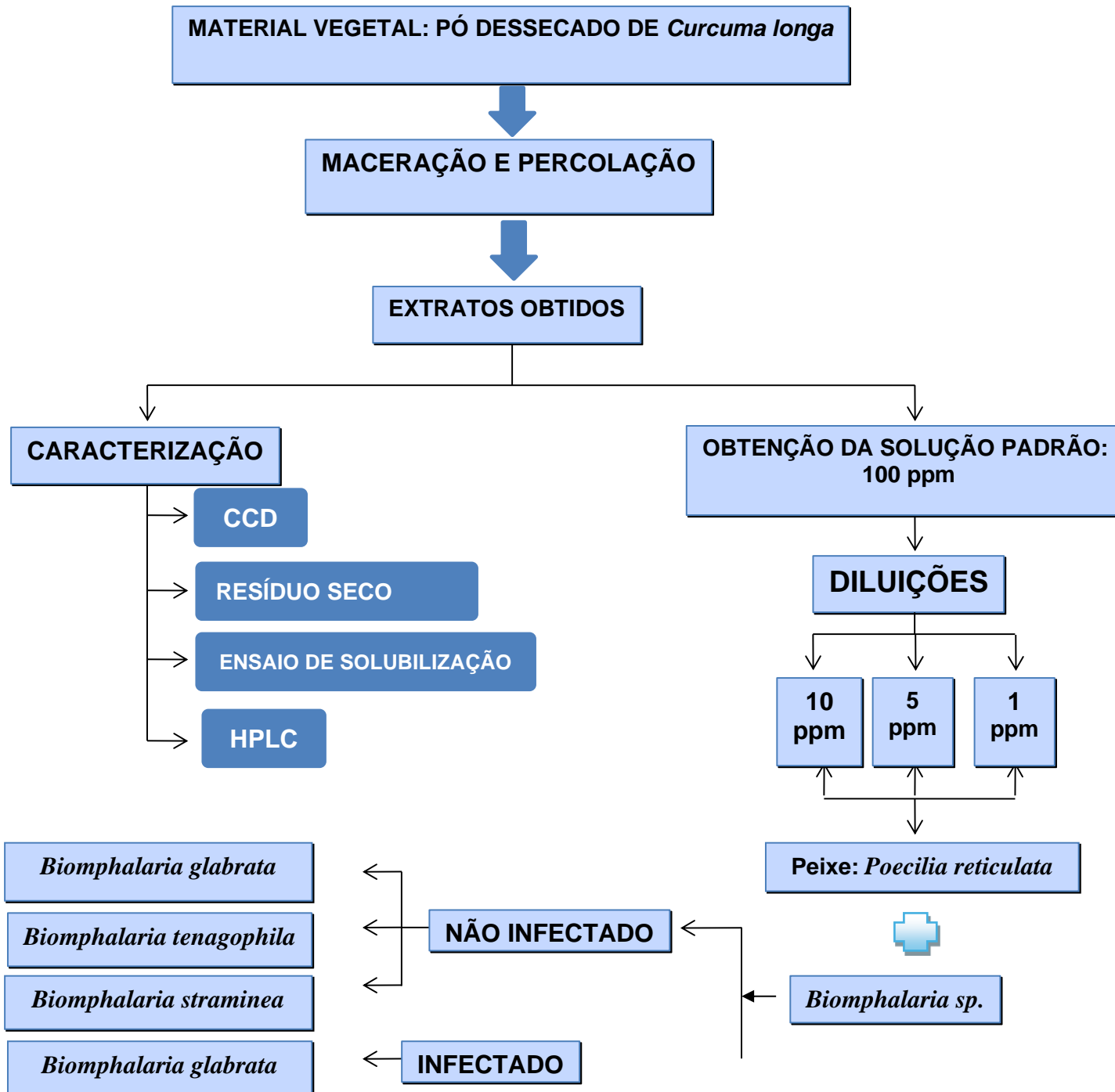
Para avaliação de toxicidade em espécies não-alvo, seguiu-se o mesmo protocolo de exposição do ensaio moluscicida, com as mesmas concentrações e os mesmos tempos, sendo utilizados somente peixes da espécie *Poecilia reticulata* (guppy) para exposição aos extratos de *Curcuma longa*.

4.3 Análise Estatística

Foi realizado o teste estatístico: ANOVA (análise de variância) e teste t * $p < 0,05$ para resultados dos ensaios HPLC e resíduo seco dos extratos etanólico e acetônico, com objetivo de avaliar a significância do efeito e estabilidade em relação ao tempo.

Segue abaixo fluxograma mostrando as fases do trabalho.

Figura 8 – Fluxograma representando as fases do trabalho, a partir da obtenção da *Curcuma longa* e realização dos experimentos, exposição dos moluscos as concentrações.



Fonte: Autoria própria.

5 RESULTADOS

5.1 Extrato obtido

Como resultado da pesagem e mistura dos solventes orgânicos com o rizoma em pó de *Curcuma longa* antes de submeter ao processo de percolação, neste caso, com álcool etílico, é possível observar o material com aspecto pastoso e forte tonalidade amarela, característico dos curcuminóides, figura 9.

Figura 9 – Processo de pesagem e obtenção do material para posterior percolação



Fonte: Autoria própria

Obeve-se como resultado do processo de maceração e percolação, 1 litro de extrato de *Curcuma longa* com solvente orgânico álcool etílico, como é possível observar na imagem a seguir (figura 10) e outro extrato à base de acetona.

Figura 10 – Extrato de *C. longa* obtido após processo de percolação



Fonte: Autoria própria.

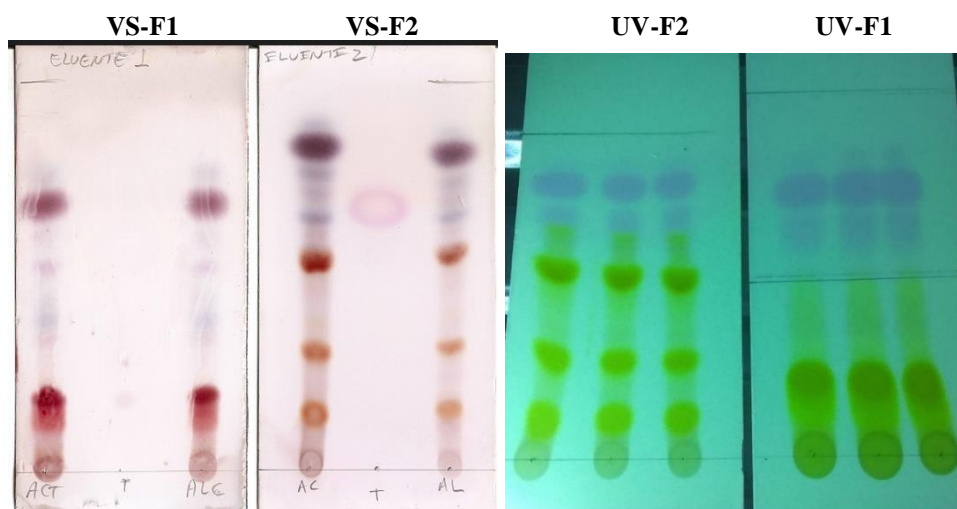
5.2 Caracterização

5.2.1 Cromatografia de camada Delgada (CCD)

Após aplicação das amostras em placa de sílica, e submetido a corrida em eluentes, foram obtidos os cromatogramas dos extratos etanólico e acetônico aplicados, nas respectivas fases móveis; (1): tolueno e acetato de etila (93:7) para terpenos e (2): clorofórmio: ácido acético glacial:água (95:5:1) para pigmentos, onde podemos observar menor separação dos curcuminoides dos extratos aplicados na fase móvel (1), pois se acumularam no R_f (fator de retenção) próximo a 0,2 e as manchas com tonalidade avermelhadas característica de sequiterpenos se apresentaram com maior intensidade, com R_f próximo a 0,7.

Para fase móvel (2), podemos observar maior separação dos curcuminoides do extrato, com 3 manchas principais com R_f (s) 0,15, 0,31 e 0,54, além de uma mancha principal devido aos terpenos no R_f (s) 0,82. (levando em consideração a solubilidade e afinidade dos curcuminoides por ácido acético), com manchas distribuídas pela placa, com R_f (s) variando entre 0,2 e 0,5, com ênfase para a presença dos três principais pigmentos com tonalidade amarela: curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxi-curcumina, além de compostos secundários presentes de tonalidade violeta-azul, característico de óleos essenciais. De acordo com a Farmacopeia brasileira 6ª edição, a presença das três zonas principais em sequência, estão relacionadas aos três componentes principais da *Curcuma longa*, como se pode observar na figura 11, a seguir.

Figura 11 – Resultado da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizada em 2022. Revelação em vanilina sulfúrica: visível fase 1, visível fase 2. UV Fase 2, UV Fase 1 (254nm).



Fonte: Autoria própria

Após 18 meses, realizamos a repetição da CCD, no qual os obtivemos cromatogramas dos extratos etanólico e acetônico aplicados a placa de sílica. Para fase móvel 1 observamos maior retenção em ambos os extratos, em contraste com a fase móvel 2, que observamos maior distribuição das manchas pela placa e variedades de tonalidades, com $R_f(s)$ variando entre 0,5 e 0,2, como podemos observar na figura 12. Observamos assim pouca diferença nos perfis cromatográficos em comparação com ensaio realizado em 2022.

Figura 12 – Resultado da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizada em 2024. Revelação UV 254 nm, fase 2 e fase 1.

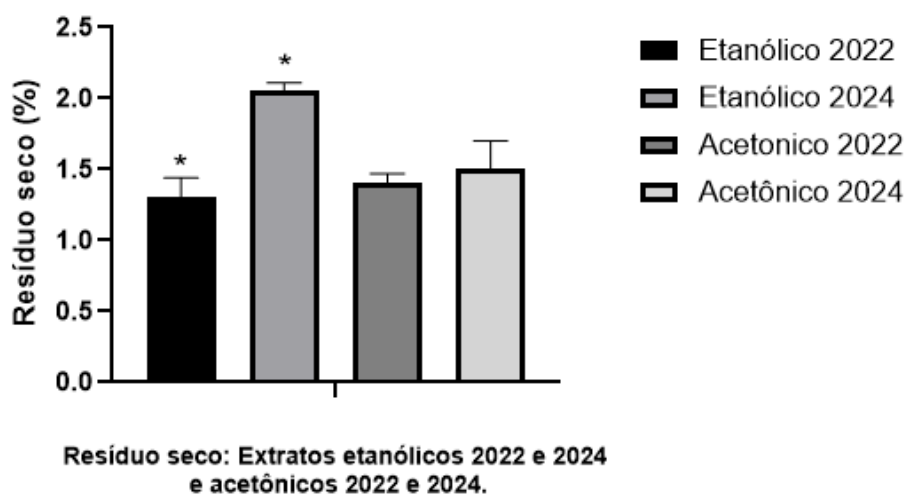


Fonte: Autoria própria.

5.2.2. *Resíduo Seco*

Após adição de 10 ml dos extratos e consequente evaporação dos solventes, foram obtidos resíduos de coloração castanho escuro presentes nas cápsulas de porcelana. A pesagem foi realizada antes e depois da evaporação. Os resultados da análise estão expressos na figura 13 a seguir.

Figura 13 – Resíduo seco dos extratos etanólico 2022 e 2024 e acetônico 2022 e 2024.



Fonte: Autoria própria

Como resultado do ensaio, observamos diferença significativa ($P < 0,05$) para extrato etanólico de 2024 em relação ao extrato etanólico 2022, após 18 meses, possivelmente atribuído a evaporação do solvente presente e consequentemente maior concentração do extrato. Não foram observadas alterações significativas nos extratos acetônicos.

Para realização dos ensaios de caracterização foram preparados 100 ml de solução, cada uma contendo 50 mg de resíduo seco do extraído de *Curcuma longa*. Na imagem a seguir, figura 14, o material obtido, devidamente preparado e identificado.

Figura 14 – Amostras em 100 ml, contendo 50 mg de *Curcuma longa*, preparada a partir do extrato seco.

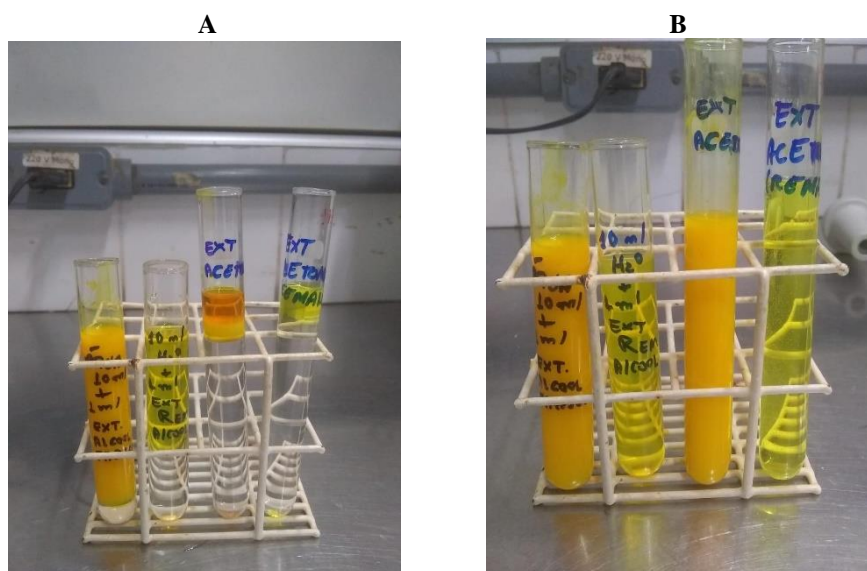


Fonte: Autoria própria

5.2.3 Ensaio de Solubilização

A partir da mistura dos extratos orgânicos com a água, foi obtido, a princípio, duas fases nos tubos de ensaio. Após homogeneização, obteve-se uma dispersão de aspecto turvo de cor amarelo-claro, como é possível observar na figura 16 a seguir. Diante da alta turbidez das amostras se fez necessário adição de tensoativo, para proporcionar aspecto límpido e efetivar a solubilização.

Figura 15 – A -Ensaio de solubilização dos extratos de *C. longa* em água, antes da homogeneização. B: Após homogeneização em água destilada.



Fonte: Autoria própria.

5.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) tem finalidade de quantificar e analisar os componentes do extrato através do cromatograma. Os extratos a base de etanol e acetona foram diluídos na proporção de 1:50 (1 ml do extrato em fase móvel até completar 50 mL). Os resultados dos cromatogramas foram obtidos a partir da detecção em comprimento de onda de 425 nm, nos quais evidenciam os três picos principais, referentes aos três componentes principais da *Curcuma longa*, como é possível observar na tabela 2, a porcentagem em média e desvio padrão das áreas sob os picos principais obtidos dos extratos.

Tabela 2 – Médias e desvios padrão das áreas sob os picos principais dos 3 curcuminóides obtidos dos extratos alcoólico e acetônico em 2022 e 2024.

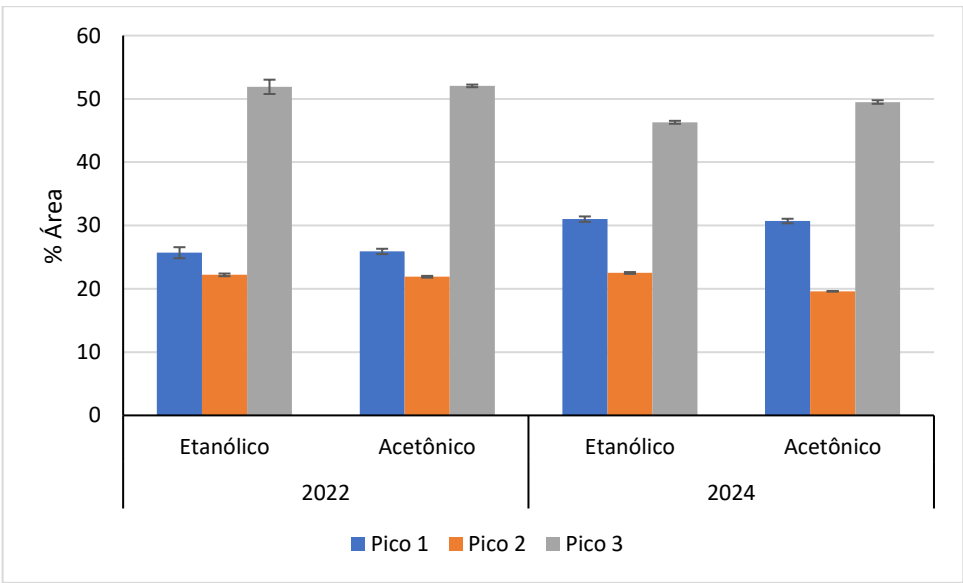
Picos	2022		2024	
	Extrato Etanólico	Extrato Acetônico	Extrato Etanólico	Extrato Acetônico
Pico 1	25,7%±0,87	25,9%±0,42	31,0%±0,43	30,7%±0,36
Pico 2	22,2%±0,21	21,9%± 0,14	22,5%± 0,14	19,6%±0,05
Pico 3	51,9%±1,13	52,05%± 0,21	46,3%±0,23	49,5%±0,28

Legenda: Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o pico 2 do extrato etanólico obtido em 2022 e o mesmo avaliado em 2024. Para os demais picos e houve diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado os extratos nos diferentes anos.

Fonte: Autoria própria

Realizada a comparação entre os picos 1, 2 e 3, presentes no perfil cromatográfico em HPLC, com objetivo de avaliar os extratos em relação ao tempo (18 meses) para extrato etanólico e acetônico, de acordo com os valores percentuais foi aplicada análise de variância e obtido o valor de p para avaliação da significância dos resultados. Diante disso observou-se diferença significativa para o pico 1 e 3 em ambos os extratos após 18 meses, ($P<0,05$). Para o pico 2 foi possível observar diferença significativa ($p<0,05$) apenas para o extrato acetônico de *C. longa*, após 18 meses, de acordo com as figuras 16 a seguir. Possivelmente ocorreu a oxidação de compostos presentes no extrato por interação com meio.

Figura 16 – Médias e desvios padrões das áreas dos picos principais dos três curcuminóides obtidos dos extratos etanólico e acetônicos nos anos de 2022 e 2024.



Fonte: Autoria própria.

5.2.5 Soluções para ensaio do efeito moluscicida

A partir da solução principal de 100 ppm dos extratos etanólicos e acetônicos de *Curcuma longa*, foram realizadas diluições para as demais concentrações (1, 5 e 10 ppm) para ensaio moluscicida. As soluções principais de 100 ppm, de ambos os extratos, possuem aspecto límpido e coloração característica, como é possível observar na figura 17.

Figura 17 – Solução principal de 100 ppm, extrato de *Curcuma longa* sem solvente residual.



Fonte: Autoria própria

5.2.6 Ensaio sobre efeito moluscicida.

Com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade moluscicida do extrato de *Curcuma longa* e estabilidade do material percolado, foram obtidos resultados dos experimentos realizados no instituto René Rachou, experimentos estes realizados em julho de 2022 com extrato e diluição preparados em julho de 2022 (**E1**), comparados aqui com experimento realizado em abril de 2024 com o mesmo extrato, mas com diluições preparadas em 2024 (**E2**), para *Biophalaria glabrata* não infectados e infectados.

A mortalidade foi observada através da imobilidade, retração total e permanente do molusco, liberação de hemolinfa e descoloração da concha.

Obtivemos como resultado sobre *Biomphalaria glabrata*, **não infectados**, mortalidade de 80% na concentração de 10 ppm para o extrato etanólico (E12022) após 48 horas de exposição e de apenas 20% para o extrato acetônico na mesma concentração. No entanto, passados 18 meses, as mesmas soluções diluídas (E1 2024) nas mesmas concentrações (1, 5 e 10 ppm) passaram a apresentar uma maior letalidade sobre a mesma espécie, nas mesmas

condições experimentais, promovendo 100% de mortalidade nas concentrações de 10 ppm já nas primeiras 24 horas, tanto para o extrato etanólico quanto para o acetônico.

Para *Biomphalaria glabrata* **infectados** expostos ao extrato E1 2022, foi possível observar mortalidade de 100% em 10 ppm para ambos os extratos (etanólico e acetônico) após 48 horas, com ênfase para o etanólico na concentração de 1 ppm que proporcionou 100% de mortalidade após 48 horas de exposição. Referente ao extrato E1 2024, a mortalidade de 90% e 100% foi observada nas concentrações de 5ppm e 10 ppm respectivamente, para o extrato acetônico em 24 horas de exposição. O extrato etanólico proporcionou mortalidade de 100% em 5 ppm e 10 ppm, em 24 horas de exposição, como é possível observar na tabela 3 a seguir.

Referente aos moluscos *Biomphalaria glabrata* **não-infectados** expostos ao extrato E2 2024, foi observada mortalidade de 50% destes na concentração de 10 ppm após 24 horas de exposição e 20% para concentração de 5 ppm. Quanto ao extrato etanólico, houve mortalidade entre 70% e 80% em 1ppm e 5 ppm respectivamente, enquanto na concentração de 10 ppm houve 100 % de mortalidade após 24 horas de exposição.

Moluscos *Biomphalaria glabrata* **infectados**, expostos ao extrato E2 2024, sofreram 100 % de mortalidade quando expostos ao extrato etanólico, nas concentrações de 1ppm, 5ppm e 10 ppm. O extrato acetônico proporcionou mortalidade de 80% em 1 ppm e 5ppm após 96 horas de exposição e 100% em 10 ppm após 24 horas. Os resultados descritos podem ser observados na tabela 4 a seguir.

Os ensaios de mortalidade realizados com *Biomphalaria tenagophila* do Taim (não infectados), dos extratos E1, apesar de terem apresentado mortalidade de 100% em 10 ppm a partir de 24 horas após estímulo, para extrato acetônico e 80% na mesma concentração para extrato etanólico, observamos que a 1 e 5 ppm não houve nenhuma mortalidade em nenhum dos extratos, como é possível observar na tabela 4. Experimento realizado com *Biomphalaria straminea*, não infectados por *Schistosoma mansoni*, apresentou mortalidade de 90% em 10 ppm, 48 horas de exposição para o extrato acetônico e 90% de mortalidade na concentração de e 10 ppm, para extrato etanólico após 24 horas de exposição.

Tabela 3 - Expressão da mortalidade de espécies de *B. glabrata* não infectadas e infectadas sujeitas a ação dos extratos de *C. longa* em diferentes concentrações recentemente preparados (E1 2022) e o mesmo extrato após 18 meses de armazenamento (E1 2024). Foram empregados 10 caramujos por ensaio.

Extrato E1 2022	Mortalidade (n)						Extrato E1 2022	Mortalidade (n)					
<i>B. glabrata</i> Não infectada	24	48	72	96	168	←Tempo (h)→ Concentração (ppm)	<i>B. glabrata</i> infectada	24	48	72	96	168	
Extrato acetônico	0	0	0	0	0	1,0	Extrato acetônico	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	5,0		2	7	7	7	8	
	0	0	2	2	2	10,0		2	10	10	10	10	
Extrato etanólico	0	0	0	0	0	1,0	Extrato etanólico	1	10	10	10	10	
	0	0	0	0	0	5,0		2	2	2	2	2	
	0	8	8	8	8	10,0		0	10	10	10	10	
Controle	0	0	0	0	0		Controle	0	0	0	0	0	
Extrato E1 2024	Mortalidade (n)						Extrato E1 2024	Mortalidade (n)					
<i>B. glabrata</i> Não infectada	24	48	72	96	168	←Tempo (h)→ Concentração (ppm)	<i>B. glabrata</i> infectada	24	48	72	96	168	
Extrato acetônico	0	0	0	0	0	1,0	Extrato acetônico	0	0	0	2	3	
	0	1	1	1	1	5,0		9	9	9	9	9	
	10	10	10	10	10	10,0		10	10	10	10	10	
Extrato etanólico	0	0	1	1	1	1,0	Extrato etanólico	0	1	4	5	5	
	0	1	1	1	1	5,0		10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10,0		10	10	10	10	10	
Controle	0	0	0	0	0		Controle	0	0	0	0	3	

Fonte: autoria própria.

Tabela 4 – Expressão da mortalidade de espécies de *B. glabrata* não infectadas e infectadas sujeitas a ação dos extratos de *C. longa* em diferentes concentrações recentemente preparados (E2 2024) e sobre espécies de *B. tenagophila* e *B. straminea* não infectadas, sujeitas ao extrato após 18 meses de armazenamento (E1 2024). Foram empregados 10 caramujos por ensaio.

Extrato E2 2024	Mortalidade (n)						Extrato E1 2024	Mortalidade (n)				
<i>B. glabrata</i> Não infectada	24	48	72	96	168	←Tempo (h)→ Concentração (ppm)	<i>B. tenagophula</i> Não infectada	24	48	72	96	168
Extrato acetônico	0	0	0	0	0	1,0	Extrato acetônico	0	0	0	0	0
	2	2	2	2	2	5,0		0	0	0	1	1
	5	5	5	5	5	10,0		10	-	-	-	-
Extrato etanólico	7	7	7	8	8	1,0	Extrato etanólico	0	0	0	0	0
	7	7	7	7	8	5,0		0	0	0	0	0
	10	10	10	10	10	10,0		8	8	8	8	8
Controle	0	0	0	0	0		Controle	0	0	0	0	0
Extrato E2 2024	Mortalidade (n)						Extrato E1 2024	Mortalidade (n)				
<i>B. glabrata</i> infectada	24	48	72	96	168	←Tempo (h)→ Concentração (ppm)	<i>B. straminea</i> Não infectada	24	48	72	96	168
Extrato acetônico	2	6	7	8	8	1,0	Extrato acetônico	0	0	0	0	0
	7	8	8	8	8	5,0		0	0	1	3	3
	10	10	10	10	10	10,0		3	9	9	9	9
Extrato etanólico	5	10	10	10	10	1,0	Extrato etanólico	0	0	0	2	2
	10	10	10	10	10	5,0		3	9	9	9	9
	10	10	10	10	10	10,0		9	9	9	9	9
Controle	0	0	0	0	0		Controle	0	0	0	0	0

Fonte: autoria própria.

5.2.7 Toxicidade sobre espécie não-alvo.

Após exposição dos peixes *Poecilia reticulata* aos extratos de *Curcuma longa*, observou-se mortalidade de todos os expostos a partir 24 horas após estímulo, em todas as concentrações, para ambos os extratos, como acetônico e etanólico, demonstrando toxicidade do extrato para espécie não-alvo, como é possível observar na tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Efeito dos extratos de *Curcuma longa* sobre espécie não-alvo; *Poecilia reticulata* (guppy). Foram empregados 10 peixes por concentração.

Extrato	Concentração (ppm)	Mortalidade (n)				
		Tempo (h)	24	48	72	96 168
Acetônico	1,0	10	-	-	-	-
	5,0	10	-	-	-	-
	10,0	10	-	-	-	-
Etanólico	1,0	10	-	-	-	-
	5,0	10	-	-	-	-
	10,0	10	-	-	-	-
Controle	-	0	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O extrato utilizado estava na proporção de 1:5 (D:S) ou 20% p/v, como recomenda a EMEA, 2015, (European Medicines Agency). O perfil cromatográfico e visualização dos componentes dos extratos foi obtido a partir da revelação em vanilina sulfúrica e UV-254 nm. Testes aplicados na identificação de componentes de extrato incluem, por exemplo cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como reveladores vanilina sulfúrica e UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm (Almeida, 2006).

Para análise qualitativa do extrato, como verificação da presença de componentes não voláteis além dos componentes principais, realizamos cromatografia em camada delgada para identificação de pigmentos principais de *C. longa* e compostos secundários como terpenos. Green *et al*, 2008, realizaram CCD para avaliação da *Curcuma longa* em condições semelhantes e Zhang, 2008, com objetivo de diferenciar *Curcuma longa* de outras espécies, usando CCD verificou que somente em *Curcuma wenyujin* não possuía a presença de componentes principais como: curcumina, bisdemetoxicurcumina e demetoxicurcumina.

A presença de compostos secundários, como terpenoides com tonalidades semelhantes foi obtida e identificada na placa de CCD. Latip *et al*, 2020, utilizaram CCD usando hexano e clorofórmio como fase móvel nas proporções de 20:80 respectivamente, revelando em UV nos comprimentos de onda de 254 nm, sendo possível identificar os componentes terpenoides nas tonalidades de azul escuro e roxo, na placa, com $R_f(s)$ entre 0,37 e 0,48.

Os compostos primários em vegetais são substâncias relacionadas à sobrevivência da planta, compostos essenciais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, dentre outros. Já os metabólitos secundários são substâncias relacionadas ao mecanismo de defesa vegetal contra micro-organismos patogênicos, predadores e até outras espécies vegetais, sendo ainda importante citar que a composição destes metabólitos varia entre espécies (Rangel *et al*, 2023.).

Além dos metabólitos secundários, a curcumina como composto majoritário, apresenta ação direta ou indiretamente sobre fatores de transcrição, como fator de transcrição nuclear (NF)-kB, em quimiocinas [CXCL]1 e [CXCL]2, e receptores de quimiocinas como (CXCR4), além de minimizar proteínas inibidoras de apoptose [XIAP], Bcl-1 Bcl-2 e Bcl-xL, demonstrando capacidade reguladora e mediadora de atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e pró apoptótica (Aggarwall *et al*, 2009).

Ainda referente aos compostos presentes na planta como óleos essenciais, podemos citar alguns compostos como álcoois sesquiterpênicos, monoterpenos e cetonas, que são

produtos secundários da planta, que podem proporcionar alguns efeitos tóxicos e antimicrobiano como demonstrou Cowan, 1999. Diante disso vale salientar que há diferenças quantitativas entre compostos como óleos essenciais das folhas da planta e em seu rizoma, uma vez que o extrato aqui utilizado foi obtido a partir do rizoma em pó. Segundo demonstraram Sharma *et al*, 1997, em óleos essenciais os principais compostos presentes no rizoma são: ar-turmerona (16,7- 25,7%), α -turmerona (30,1-32,0%) e β -turmerona (14,7-18,4%).

Relacionado a bioatividade de substâncias naturais como moluscicidas aplicados em moluscos *Biomphalaria glabrata*, Cantanhede *et al.*, 2010 e Rangel *et al.*, 2023 demonstraram avaliação de moluscicidas naturais com resultados promissores e significativos, obtidos de extratos ou compostos isolados a partir deste, sendo que o efeito tóxico esteja possivelmente atribuído também a taninos, flavonoides, saponinas, terpenoides, dentre outros metabólitos secundários presentes.

Quanto a caracterização do extrato de *Curcuma longa*, com a finalidade de avaliar seus componentes para uma análise de qualidade e de ação de seus compostos, como também de componentes voláteis, alguns métodos são aplicados com este objetivo, além de CCD, também é aplicado HPLC para quantificação. Chao *et al*, 2018, realizaram avaliação qualitativa e quantitativa dos curcuminoides e análise dos componentes voláteis de *Curcuma longa*, aplicando cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada fina, além de espectrometria de massa.

Além disso, Chao, *et al*, 2018 realizaram HPLC, em condições semelhantes com fase móvel (Metanol, Acetonitrila, ácido acético e coluna SB-C18 250x4,6 mm), para quantificação simultânea dos principais componentes com bioatividade da *Curcuma longa*, bisdemetoxicurcumina, desmetoxicurcumina e curcumina, além dos três voláteis: ar-turmerona, β -turmerona e α -turmerona, assim como aplicamos da mesma forma para avaliar o percentual dos componentes principais do extrato antes e após 18 meses.

Quanto a quantificação de curcuminoides presentes, Pothitirat *et al*, 2008, realizaram comparativo com uso de CLAE-DAD e espectrofotometria UV, para extrato etanólico de *Curcuma longa* e os resultados indicaram que não deve haver menos que 16% de curcuminoides totais quando determinados por CLAE-DAD e menos que 13% quando por espectrofotometria UV. Green, *et al* 2008, observaram resultados maiores quanto ao teor de curcuminoides no extrato etanólico de *Curcuma longa*, entre 47,1 % e 55,5%.

Chao *et al*, 2018 avaliaram também a estabilidade dos componentes com seis análises durante 48 horas, realizando a cada 6 horas e obtendo os resultados verificando através de desvio padrão que houve estabilidade dos compostos durante as 48 horas.

Constatamos a estabilidade dos extratos após 18 meses e verificamos efetividade e aumento da ação após este período, podendo ser atribuído a concentração do extrato após evaporação com o passar do tempo. Quanto ao período de estocagem, manutenção e estabilidade dos componentes principais da *Curcuma longa*, Ganpati *et al*, 2011, relataram que em até 30 meses de armazenamento pode haver o aumento de curcumina de 3,43% a 5,79%. Além de observar que para o pico 1 através do cromatograma em HPLC, verificamos aumento de 4,4% para extrato etanólico e 5% para acetônico, após 18 meses.

Observamos mortalidade de 100 % em 10 ppm em nossos ensaios com *B. glabrata* não infectados e infectados por *S. mansoni*, com ênfase para extrato etanólico. Para ação moluscicida de extratos, Who (1983) recomenda que uma planta para ser considerada efetiva como moluscicida, deve proporcionar 90% de mortalidade em uma concentração de 20 ppm para extratos e 100 ppm para o vegetal bruto, dessa forma o principal responsável pela ação moluscicida do extrato de *Curcuma longa* é a curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) como composto majoritário e seus derivados, com capacidade de efeito antiparasitário e potencial ação moluscicida, como demonstraram Silva Filho *et al.*, 2009.

Obtivemos para *B. glabrata* não infectado 100% de mortalidade com extrato etanólico em 24 horas na concentração de 10 ppm. Silva Filho *et al*, 2009 embora tenham usado compostos secundários e voláteis demonstraram a partir dos derivados de *C. longa* como oleoresina e óleo essencial, atividade moluscicida, com mortalidade para *Biomphalaria glabrata* não infectados por *S. mansoni* de 95% e 94%, respectivamente, quando expostos as concentrações de 80 e 70 microgramas por mL (ppm).

A curcumina é bastante solúvel em álcool etílico e ácido acético e pouco solúvel em água, de acordo com os dados da plataforma pubchem, podendo assim proporcionar maior capacidade de extração (Lide, *et al*, 1994; O'neil, 2013). Com o extrato etanólico de *Curcuma longa* verificamos mortalidade entre 90 e 100% em 10 ppm para *B. glabrata* adultos não infectadas. Matos *et al.*, 2019, realizaram avaliação biológica moluscicida através da curcumina isolada, em moluscos *Biomphalaria glabrata* jovens e adultos não infectados por *S. mansoni*, com diâmetros entre 2mm e 15-18mm avaliando as concentrações letais aos moluscos expostos a curcumina, demonstrando efetividade deste com mortalidade de 90%.

Ainda referente a extratos etanólicos, observamos melhores resultados com percentual de mortalidade de 100% em 10 ppm para E1 e também para E2 o qual apresentou maiores efeitos em outras concentrações. Além de *C. longa*, outras espécies vegetais são citadas na literatura com efetividade em sua ação moluscicida, como demonstrado por Rocha *et al.*, 2013, em que extrato etanólico das raízes de *J. elliptica* proporcionou 100% de mortalidade em

Biomphalaria glabrata não infectados, após 96 horas de exposição, com mesmo resultado sendo reproduzido por extrato etanólico de *A. muricata*. O extrato hidroalcoólico das folhas de *Momordica charantia* L. apresentou atividade moluscicida na concentração de 100 ppm, com 85% de mortalidade, como demonstraram Cordeiro, *et al.*, 2010.

O extrato E2 etanólico proporcionou em moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados, mortalidade de 100% nas concentrações de 10, 5 e 1 ppm. Esse nos parece ser o primeiro dado referente a ação da *Curcuma longa* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*. A diferença nos resultados em mortalidade para *Biomphalaria glabrata* infectados por *S. mansoni* aqui apresentados, podem estar relacionadas a vulnerabilidade fisiológica destes moluscos infectados e a ação dos componentes principais e compostos secundários do extrato. Mello-Silva, *et al*, 2010, observaram efeitos fisiológicos como redução nas taxas de reserva de glicogênio em *B. glabrata* infectados por *S. mansoni*, expostos ao látex de *E. splendens*. Diante disso, inferimos e atribuímos estes efeitos a vulnerabilidade fisiológica dos moluscos infectados.

Katz *et al*, 2017 usando a ivermectina (0,01µg/mL) demonstraram maior mortalidade em *Biomphalaria glabrata* infectados por *S. mansoni* com 100% de mortalidade quando comparado ao grupo não infectado, enquanto na mesma concentração proporcionou 30% de mortalidade em espécie não-alvo (peixe guppy), sendo atribuído este efeito a danos fisiológicos como hepatopancreático, responsável pelo metabolismo do caramujo.

Nossos dados demonstraram que basicamente não houve mortalidade nas concentrações de 1 e 5 ppm de ambos extratos em *Biomphalaria tenagophila* do Taim demonstrando neste caso maior resistência em relação a *Biomphalaria glabrata*.

Quanto aos dados obtidos para *B. tenagophila* e a diferença do impacto dos extratos de *Curcuma longa* nestes, com menor mortalidade, podemos atribuir a combinação de mecanismos de defesa e adaptação, como demonstraram Bezerra *et al*, 2003, como por exemplo: a capacidade de reparo dos hemócitos, ativação de vias de sinalização, quando expostos a condições estressantes, que desencadeiam respostas adaptativas e manutenção da integridade celular.

Em relação a *Biomphalaria straminea* foi observada mortalidade de 90% em 10 ppm para extrato E1 acetônico e 90% para etanólico E1 em 5 e 10 ppm, demonstrando efeito maior nesta espécie. Araújo *et al.*, 2019, demonstraram o efeito moluscicida a partir de uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Xylopiya ochrantha* em 32, 47 e 78 ppm em moluscos juvenis entre 3-5 mm de *B. straminea* obtendo mortalidade entre 90% e 100% após 24 horas de exposição.

Os efeitos fisiológicos proporcionados por moluscicidas, segundo Mello-Silva *et al.*, 2006 em caramujos expostos a látex de *E. milli*, são, por exemplo: alteração do teor de proteína na hemolinfa em *B. glabrata*. McCullough *et al.*, 1980, também relataram que moluscicidas induzem alterações como estresse no sistema de balanço hídrico do molusco e em seu sistema neuro-hormonal, tendo como consequência duas formas para morte do molusco: retração da massa cefalopodal para dentro da concha e consequente liberação de hemolinfa ou projeção anormal do cefalópode para o exterior da concha, sendo aquela, primeira forma citada a observada neste estudo, como principal manifestação a exposição ao extrato de *Curcuma longa*.

Além disso, referente aos efeitos dos extratos E1 e E2, após 18 meses, podem estar relacionados a evaporação de solventes do material percolado do qual foram preparados os extratos E1 e E2, como pode ser observado a partir dos resultados do material seco quando comparados antes e após 18 meses, com ênfase para o extrato etanólico que obteve maior percentual de resíduo seco após o período supracitado, proporcionando maior concentração do extrato e consequentemente maior efeito.

Quanto a toxicidade do extrato de *Curcuma-longa* em espécies não-alvo, observamos mortalidade total dos peixes expostos. Assim como demonstraram Silva Filho *et al.*, 2009, em ensaio realizado com microcrustáceo *Artemia salina*, para expressar a toxicidade da oleoresina de *Curcuma-longa* nesta espécie. Observaram também a toxicidade quando submetidos a concentração de até 100 ppm, afetando os crustáceos com 33% de sobrevivência, além de proporcionar mortalidade de 95% dos moluscos *Biomphalaria glabrata* entre concentrações de 70 e 80 ppm de oleoresina de *Curcuma-longa*, demonstrando ser um moluscicida efetivo, no entanto afetando população não-alvo.

Colaborando com estes resultados, Andrade *et al.*, 2018, realizaram avaliação de toxicidade da curcumina em peixes zebrafish (*Danio rerio*) e demonstraram toxicidade deste, afetando a população com sobrevivência de 60% quando expostos a concentração de 1,9 ppm de curcumina, sendo a concentração que apresentou maior contraste em relação ao grupo controle.

Quanto ao uso integrado de extratos na estratégia de combate a esquistossomose, é importante citar que uma limitação no uso da curcumina ou extrato de *Curcuma-longa* para uma ação combinada com tratamento em massa e controle da população de hospedeiro intermediário da esquistossomose, diz respeito a baixa solubilização em meio aquoso e biodisponibilidade baixa deste composto, o que pode dificultar a ação neste meio sendo necessário bom planejamento na técnica de aplicação e desenvolvimento de pesquisas no

âmbito com o objetivo de obter novas técnicas associativas para uma maior efetividade na aplicação e em resultados (Hussein, 2017).

7 CONCLUSÃO

O extrato de *Curcuma longa* proporcionou ação moluscicida em moluscos *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* não infectados, além de elevada mortalidade em *Biomphalaria glabrata* infectados por *Schistosoma mansoni*, em relação ao grupo não infectado, com ênfase para efeito do extrato etanólico que proporcionou resultados significativos em relação ao extrato acetônico, sendo este último resultado possivelmente pioneiro relacionado a *C. longa* e *B. glabrata* infectado. Mesmo após 18 meses de preparação, o extrato demonstrou estabilidade e efetividade, o fato de ter proporcionado também efeitos tóxicos em espécies não-alvo (peixe), mostra que a sua utilização como moluscicida natural alternativo e específico no combate a população de hospedeiro intermediário da esquistossomose tenha uma indicação limitada, até que novos testes sejam feitos, demonstrando sua ação no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M; et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.
- ALMEIDA, L. P. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa* L., avaliação da atividade antimicrobiana e morfogênese in vitro na produção de pigmentos curcuminóides e óleos essenciais.** Faculdade de Farmácia, UFMG (Tese de Doutorado). 2006. p. 120.
- AGGARWALL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the roles of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern tagets. **Cell Press**. v. 30, p. 85-94, 2009.
- AÇAFRÃO - O ouro da cozinha. Globo Rural, Rio de Janeiro, n. 110, p.38-43, 1994.
- ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochem. Pharmacol.** v. 76, p 1590, 2008.
- ANDRADE, L. A. D.; LIMA, C.; RIBEIRO, R. P. et al. avaliação da toxicidade da curcumina (*Curcuma longa*) em embrião de zebrafish. In: VI Simpósio de engenharia e ciência de alimentos, 2018, São José do Rio Preto. **Anais eletrônicos**. Campinas, Galoá, 2018.
- ANDRADE, Z. A.; BINA, J.C. The changing pattern of pathology due to *Schistosoma mansoni* infection. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, n. 3, p. 363-6, 1985.
- ANDRADE, Z.; PEIXOTO, E. Pathology of periportal fibrosis involution in human schistosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 34, n. 3, p. 263-72, 1985.
- AMARAL, R. S.. Vigilância e controle dos moluscos de importância médica. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica : diretrizes técnicas**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. p. 108-110.
- ARAÚJO, F. de P.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; RANGEL, L. S. et al. Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopi ochrantha* Mart. produces molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (*Schistosoma* hosts). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, p. 1-8, 2019.
- ARAÚJO, K. C. G. M.; RESENDES, A. P. da C.; SOUZA-SANTOS, R. Spatial analysis of *Biomphalaria glabrata* foci and human cases of *mansoni* schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil, in the year. **Cad Saude Publica**. v. 23, p. 409-417, 2007.
- BARBOSA, C. S.; FAVRE, T. C.; AMARAL, R. S. et al. Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansonii. In *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz**. p. 965–1008, 2008.

BARBOSA, F. S.; OLIVIER L. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in northeastern Brazil. **Bull WHO**. v. 18, p. 895–908, 1958.

BARCLAY, L. R.; VINQVIST, M. R.; MUKAI, K. et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. **Org Lett**. v. 2, n. 18, p. 2841-3, 2000.

BAKER, F. C. Subfamilies, Genera, and Subgenera – Recent and Fossil. In Baker FC. The molluscan family Planorbidae. University Illinois press Urbana. **Duediligence**. v. 50, 1945. Disponível em: <<http://www.biodiversitylibrary.org/permissions.>>

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-30, 2002.

BEZERRA, F. S. de M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; MARTINS-SOUZA, R. L. et al. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of Schistosoma mansoni infection in resistant Biomphalaria tenagophila snails. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 73–75, 2003.

BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA (EUA), Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia; 2004-. Resumo do composto PubChem para CID 969516, **Curcumina**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. 4. ed. –Brasília: Ministério da Saúde. 144 p, 2014.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Projeto de Integração do Rio São Francisco com Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional – Relatório de Impacto Ambiental (RIMA)**. Brasília: MIN, 2004. 136 p. Disponível em: <<http://www.mi.gov.br/documents/10157/3678963/Rima+-+Relat%C3%B3rio+de+Impacto+Ambiental.pdf/4324863d-cbff-4522-9bd0-eab9d34b8fe2>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços**. – 3. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 2019; 740 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2014; 144 p. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas** [online]. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 144 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. Brasília: MS: SVS, 2. ed., 2008. 178p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. Brasília: MS: SVS, 2. ed., 2008. Cap7, 85p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas**. Brasília: MS: SVS, 2014b. 144 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf Acesso em: 20 de out. 2016.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Projeto de Integração do Rio São Francisco com Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional – Consolidação dos Estudos Ambientais**. Brasília: Consórcio Ecology Brasil, Agrar Consultoria e Estudos Técnicos, JP Meio Ambiente; 2004b. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas**. Brasília: MS: SVS, 2014b. 144 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf Acesso em: 20 de out. 2016.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control**. Geneva: WHO, 2008.

CARVALHO, O. S; PASSOS, L. K. J.; MENDONÇA, L. F. G. et al. **Moluscos de importância médica no Brasil**. Belo Horizonte. 2005. 52 p.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. M.; SILVA-SOUZA, N. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010. voo. 20, não. 2, pp. 282-288.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Global Health. Division of Parasitic Diseases. **Schistosomiasis: Biology**. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html/> >. Acesso em: 11 Nov. 2016.

COURAL, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, 2004.

COURAL, J. R. Control of schistosomiasis in Brazil: perspectives and proposals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 257–60, 1995.

COURA, F. P.; MENDES, N. M.; SOUZA, C. P. et al. The prolonged use of niclosamide as a molluscicide for the control of *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop**, v. 34, p. 427–31, 1992.

COUTINHO, D. F.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 482-84, 2007.

COELHO, P. M. Z.; CALDEIRA, R. L. Análise crítica da aplicação de moluscicidas em programas de controle da esquistossomose no Brasil. **Infect Dis Pobreza**, v. 5, p. 57, 2016.

COELHO, P. M.; TOPPA, N. H.; FELDMANN, J. S. et al. Schistosoma mansoni: permanence of modulation of the granulomatous inflammatory response in mice cured in the chronic phase. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1393-5, 1996.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

COURA, J. R.; CONCEICAO, M. J.; PEREIRA, J. B. Morbidade da esquistossomose mansoni no Brasil. III. Estudo evolutivo em uma área endêmica no período de dez anos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 447-53, 1984.

CORT, W.M. Haemoglobin peroxidation test screens antioxidants. **Food Technology**, v. 28, p. 60, 1974.

CORDEIRO, L. N.; ATHAYDE, A. C. R.; VILELA, V. L. R. et al. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, p. 421-426, 2010.

COSTA, A.V.; ALMEIDA, B.R.; GONÇALVES, L.V. et al. Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) sobre *Lymnaea columela* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4, p. 707-712, 2015.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CHAO, I.C., WANG, C. M.; LI, S. P. et al. Simultaneous Quantification of Three Curcuminoids and Three Volatile Components of *Curcuma longa* Using Pressurized Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

CRAG, G. M.; NEWMANN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod**, v. 60, n. 52, 1997.

DUARTE, R. D.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Corantes - programa de pesquisa do Instituto Agrônomo de Campinas. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 1, 1989, Campinas. **Anais**. Campinas: ITAL, 1989. p. 45-53.

EMEA. European Medicines Agency. **Evaluation of Medicines for Human Use. Community Herbal Monograph on Curcuma longa L., rhizoma**. 2018.

FILHO, A. B. C.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Cienc Rural**, v. 30, n. 1, p. 171-7, jan. 2000.

GANPATI, K. S.; BHURAO, S. S.; IRANNA, K. K. et al. Comparative studies on curcumin content in fresh and stored samples of turmeric rhizomes. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 2, n. 4, p. 127-129, 2011.

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric: chemistry, technology and quality. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 199-301, 1980.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol.** v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.

GREEN, C. E.; HIBBERT, S. L.; BAILEY-SHAW, Y. A. et al. Extraction, processing, and storage effects on curcuminoids and oleoresin yields from *Curcuma longa* L. grown in Jamaica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 10, p. 3664-3670, 2008.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.
GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, n. 2, p. 383-97, 2012.

HARRIS, L. E.; ASPLUND, J.M.; CRAMPTON, E.W. An international fed nomenclature and methods for summarizing and using fed data to calculate diets. **Utah Agricultural Experiment Station Bulletin**, n. 479, p. 47-53. 1968.

HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo: Icone, 1986. 265 p.

HOTEZ, P.J.; FUJIWARA, R.T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes Infect.**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

HUSSEIN, A.; RASHED, S.; EL HAYAWAN, I. et al. Evaluation of the Anti-schistosomal Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) Versus Praziquantel in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. **Iran J Parasitol.** 2017 Oct-Dec;12(4):587-596. PMID: 29317884; PMCID: PMC5756309.

JASIM, F.; ALI, F. Measurements of some spectrophotometric parameters of curcumin in 12 polar and nonpolar organic solvents. **Microchem. J.** v. 39, p. 159, 1989.

KATZ, N.; ARAÚJO, N.; COELHO, P. et al. Ivermectin efficacy against *Biomphalaria*, intermediate host snail vectors of Schistosomiasis. **J Antibiot**, v. 70, p. 680–684, 2017.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 3, p. 303-8, 2000.

KATZ, N. ROCHA, R. S.; BARBOSA, C. S. National survey on Schistosomiasis mansoni and Geohelminths in Brazil (2011-2014). In: XIII International Congress of Parasitology – ICOPA, 2014, Mexico. **Resumos**. Friends of the Global Fund Europe, 2014.

KATZ, N. Situação atual da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses no Brasil. In: FLAP XXIV Congresso Latino Americano de Parasitologia, Santiago do Chile, 2017. **Resumos**. Santiago do Chile: Sociedad Chilena de Parasitologia (SOCHIPA), 2017.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reavaliação do custo da infecção helmíntica crônica: Uma meta-análise de resultados relacionados à deficiência na Esquistossomose endêmica. **Lancet**. v. 365, p. 1561-1569, 2005.

KIM, H. J.; JANG, Y. P. Direct analysis of curcumin in turmeric by DART-MS. **Phytochemical Analysis**. v. 5, p. 372-377, 2009.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 206-220, 2005.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Em Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Editora EMBRAPA: Belém, 2008. p. 19-26.

Lide, D.R., G.W.A. Milne (eds.). Handbook of Data on Organic Compounds. Volume I. 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. 1994., p. V3: 2933.

LIANG, X. T.; FANG, W. S. **Medicinal chemistry of bioactive natural products**, Wiley: New Jersey, 2006.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia Série Zoologia**, v. 92, n. 2, p. 213-216, 2005.

RANGEL, L. S.; GOMES, K. N. F.; SANTOS, J. A. A. et al; **Bioatividade de substâncias isoladas de produtos naturais em moluscos *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (Planorbidae): uma revisão**. Universidade Federal Fluminense – UFF, Programa de pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, Niterói, RJ, Brasil. Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Avaliação e promoção de saúde Ambiental, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2023.

RANGEL, L. D. S.; OLIVEIRA, A. P.; FALCÃO, D. Q. et al. Nanoemulsion of *Sideroxylon obtusifolium* as an Alternative to Combat Schistosomiasis. **Frontiers in Plant Science**, vol. 13, pp. 853002, 2022.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C. et al. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia*. **Caderno de pesquisa**. v. 17, p. 69-76, 2010.

MAIA, N.B. A cúrcuma como corante. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS, 2, 1991, Campinas. **Seminários**. p. 65.

MAIA, N.B, BOVI, O.A., DUARTE, F.R., et al. Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de *Curcuma longa* L. (Cúrcuma). **Bragantia**, v. 54, n. 1, p. 33- 7,1995.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R. et al. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitol Res**, v. 104, p. 1197–1201, 2009.

MAGALHÃES, L. A. Estudo do comportamento de cepa de *S. mansoni* de Brasília. **O Hospital**. v. 11, p. 273–82, 1970.

MACHADO, P. A. The Brazilian Program for Schistosomiasis Control, 1975-1979. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 31, n. 1, p. 76-86,1982.

MATOS, J. L.; SILVA, K. R.; PAULA, L. A. L. et al. Atividade moluscicida e cercaricida da curcumina em *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Ciência do manejo de pragas**. v. 76, n. 4, p. 1228-1234, 2019.

ROCHA, T. J. M.; FILHO, B. P. N.; NOÉ, B. D. R. et al. ESTUDO DO EFEITO MOLUSCICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS EM EMBRIÕES E CARAMUJOS ADULTOS DE *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 42, n. 2, 2013.

MARTINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C. C.; RAMOS, A. N. J. et al. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 14, p. 1055-1062, 2014.

MARTINS, M.C.; RUSIG, O. Cúrcuma: um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 56-65, 1992.

MATOS ROCHA, T. J.; DO NASCIMENTO FILHO, B. P.; DA ROCHA NOÉ, B. D. et al. ESTUDO DO EFEITO MOLUSCICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS EM EMBRIÕES E CARAMUJOS ADULTOS DE *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 42, n. 2, 2013.

MCCLLOUGH, F. S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J. Molluscicides in schistosomiasis control. **B World Health Organ**, v. 58, p. 681-689, 1980.

MENEZES, F. S.; SILVA, C. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; BORSATTO, A. S.; KAPLAN, M. A. C. Molluscicidal constituents of *Marsypianthes chamaedrys*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 433-435, 1999.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J. Alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata; Planorbidae) causadas por concentrações subletais do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* NEB (Euphorbiaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 1-6, 2006.

MELLO-SILVA, C. C.; VILAR, M.; VASCONCELLOS, M. C. et al. Alterações no metabolismo de carboidratos em *Biomphalaria glabrata* infectados por *S. mansoni* expostos a *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* latex. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 105, p. 492-5, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica**. Dietrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose, (PCE), Brasília, 2008.

Ministry of Health (Brazil). Surveillance of Schistosomiasis mansoni in Brazil. Press to Ministry of Health, **Dietrizes técnicas**. v. 4, p. 93-4, 2014.

LATIP, S. N. H.; IBRAHIM, R.; RAMLI, N. K. C. M. Molluscicidal Activity of Fresh Leaves from *Curcuma longa* and *Piper betle* Essential Oil against *Pomacea canaliculata*. **ASM Sc. J.**, v. 13, n. 6, 2020.

NAKSURIYA, O.; OKONOGI, S.; CHIFFELERS, R.M. et al. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, p. 3365-3383, 2014.

NDJONKA, D.; RAPADO, L. N.; SILBER, A. M. et al. Produtos naturais como fonte para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas. **Int J Mol Sci**. v. 6, p. 3395-3439, 2013.

O'NEIL, M.J. **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, The Merck Index. 2013., p. 474.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Esquistossomose**, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/esquistossomose>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório do Grupo de Trabalho Científico sobre Moluscidas vegetais e Diretrizes para avaliação de moluscidas vegetais**. Genebra: OMS. TDR/SC 4-SWE. v. 4, 1983.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1. Rhizoma Curcumae Longae**. 1999.

PARAENSE, W. L. Self and cross-fertilization in *Australorbis glabratus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 53, p. 285-91, 1955.

PARAENSE, W. L. The sites of cross and self-fertilization in planorbid snails. **Rev Brasil Biol**. v. 36, p. 535-9, 1976.

PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in the Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 7-16, 2001.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J. Currently available molluscicides. **Parasitol Today**. v. 12, p. 156-9, 1996.

PIERI, O. S.; GONÇALVES, J. F.; SARQUIS, O. Repeated focal mollusciciding for snail control in sugarcane area of northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 90, p. 535-6, 1995.

POTHITIRAT, W.; GRITSANAPAN, W. Variability of curcuminoids: Antioxidative components in ethanolic turmeric extract determined by UV and HPLC methods. **Acta Horticulturae**. v. 786, p. 175-184, 2008.

PRATA, A. Fatores determinantes das formas anátomo-clínicas e evolução da esquistossomose. In: Castro, F. P.; ROCHA, P. R. S.; CUNHA, A. S. (Eds). **Tópicos em Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: MEDSI - Editora Médica e Científica Ltda, 1991.

RAMASWAMY, T. S.; BANERJEE, B. N. Vegetable dyes as antioxidant for vegetable oils. **Annals of Biochemistry and Experimental Medicinal**, v. 8, p. 55, 1948.

RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região amazônica marenhense**. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciências e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, p. 1-91, 2016.

RITCHIE, L. S. **Chemical control of snails**. In Ansari N (ed): Epidemiology and Control of Schistosomiasis (Bilharziasis). Basel, Karger. 1973; p. 458–532.

SANTOS, A. B. A.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 2, p. 197-200.

SHARMA, R.K.; MISRA, B.P.; SARMA, T.C. et al. Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan. **Journal Essential Oil Research**, v. 9, p. 589-892, 1997.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ (SESA-CE). Coordenadoria de Promoção e Proteção a Saúde - COPROM. Núcleo de Controle de Vetores – NUVET. **Boletim Epidemiológico – Esquistossomose**. Fortaleza: SESA-CE, 2016. Disponível em:<<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>>

SILVA FILHO, C. R. M. da; SOUZA, A. G. de; CONCEIÇÃO, M. M. da. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p.), 919–923, 2009.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. de P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

SOUZA, S. R. de; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Teores e qualidade das proteínas de reserva do arroz, em função de aplicação suplementar de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 575-83, 1993.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Inf. Dis.**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEICAO, M. M. et al. Avaliacao da bioatividade dos extratos de curcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19. n. 4. p. 919-923. 2009.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; SOUZA, C. P.; BAPTISTA, D. F. The molluscicidal activity of crown of christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 7–10, 1998.

WERF, M. J. V. D.; VLAS, S. J. D.; BROOKER, S. et al. Quantificação da morbidade clínica associada a infecção por Esquistossomose na África subsaariana. **Acta trop.** v. 86, p. 125-139, 2003.

VASCONCELLOS, M. L. A. A.; SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Manag Sci.** n. 3, p. 288- 292, 2005.

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de**

Vigilância das Doenças Transmissíveis. –4. ed. –Brasília: Ministério da Saúde. 2014; 144 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. 2019. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1965. **Memoranda: molluscicide screening and evaluation**. Bulletin of the World Health Organization 33:567-576

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. 2019. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.

WHO. **Expert Committee on Bilharziasis: first report**. World Health Organization Technical Report Series. 1953;65. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40211/1/WHO_TRS_65.pdf

WHO. **Molluscicides**. Second report of the WHO Expert Committee on Bilharziasis. World Health Organization Technical Report Series. 1961;214.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40484/1/WHO_TRS_214.pdf.

WHO. **The role of mollusciciding in schistosomiasis control**. Geneva: WHO/ Schisto; 1992.

ZHANG, J. S.; GUAN, J.; YANG, F. Q. et al. Qualitative and quantitative analysis of four species of Curcuma rhizomes using twice development thin layer chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 48, p. 1024– 1028, 2008.